

**SYNTHESE NEUER  
GUANOSIN – 3', 5' – CYCLOPHOSPHAT-DERIVATE  
ZUR CHARAKTERISIERUNG DER  
cGMP-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASE**

**DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

dem Fachbereich Biologie/Chemie der  
Universität Bremen  
vorgelegt

von  
**Elke Butt**  
aus Osterholz-Scharmbeck

**1989**







**SYNTHESE NEUER  
GUANOSIN -3',5'-CYCLOPHOSPHAT-DERIVATE  
ZUR CHARAKTERISIERUNG DER  
cGMP-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASE**

**DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der  
Universität Bremen  
vorgelegt

von  
**Elke Butt**  
aus Osterholz-Scharmbeck

1989



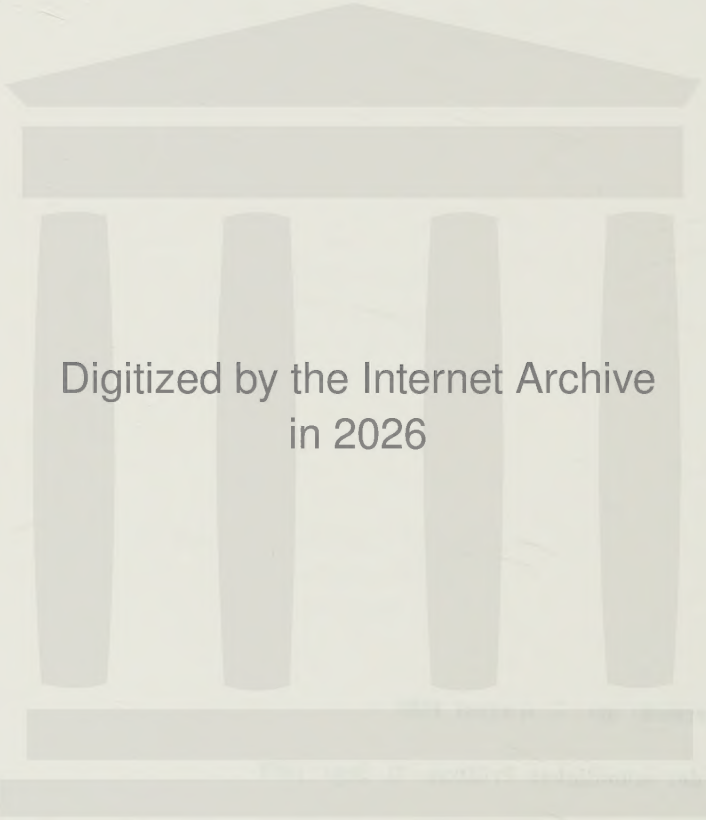
Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1987 bis Mai 1989 im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Jastorff durchgeführt.

eingereicht am: 7. August 1989

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Sept. 1989

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Jastorff
2. Gutachter: Prof. Dr. Detmar Beyersmann

Prüfer: Prof. Dr. Rüdiger Mews  
Priv. Doz. Dr. Ulrich Walter



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41543102\\_0006](https://archive.org/details/IA41543102_0006)

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|            |                                                          |
|------------|----------------------------------------------------------|
| ABR        | 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranose  |
| Ac         | Acetyl                                                   |
| ATP        | Adenosin-5'-triphosphat                                  |
| Bz         | Benzyl                                                   |
| cG-Kinase  | cGMP - abhängige Proteinkinase                           |
| cPDE       | 3',5'-Cyclonucleotidphosphodiesterase                    |
| d          | Dublett                                                  |
| DAST       | Diethylammoniumsulfurtrifluorid                          |
| DMF        | Dimethylformamid                                         |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid                                         |
| $\epsilon$ | Extinktionskoeffizient                                   |
| E          | Extinktion                                               |
| EI         | Elektronenstoßionisation                                 |
| FAB        | Fast Atom Bombardment                                    |
| HPLC       | High Performance Liquid Chromatographie                  |
| HOMO       | Highest Occupied Molecular Orbital                       |
| J          | Kopplungskonstante                                       |
| m          | Multiplett                                               |
| Me         | Methyl                                                   |
| MS         | Massenspektrometrie                                      |
| LUMO       | Lowest Unoccupied Molecular Orbital                      |
| NMR        | Nuclear Magnetic Resonance                               |
| MG         | Molekulargewicht                                         |
| OD         | Optische Dichte                                          |
| RP         | Reversed Phase                                           |
| RT         | Raumtemperatur                                           |
| s          | Singulett                                                |
| t          | Triplett                                                 |
| TASF       | Tris(dimethylamino)sulfonium - trimethyldifluorsiliconat |
| $t_R$      | Retentionszeit                                           |
| TEAF       | Triethylammoniumformiat                                  |
| TEP        | Triethylphosphat                                         |
| Triflate   | Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat                    |

|    |              |
|----|--------------|
| U  | Unit         |
| UV | Ultraviolett |

|                          |                                                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|
| cAMP                     | Adenosin - 3',5'-cyclophosphat                      |
| cAMPS                    | Adenosin - 3',5'-cyclothiophosphat                  |
| 8-BzS-cGMP               | 8-Benzylthioguanosin - 3',5'-cyclophosphat          |
| cBiMP                    | Benzimidazolribosid - 3',5'-cyclophosphat           |
| 8-Br-cAMP                | 8-Bromadenosin - 3',5'-cyclophosphat                |
| 8-Br-cGMP                | 8-Bromguanosin - 3',5'-cyclophosphat                |
| 2-CF <sub>3</sub> -cBiMP | 2-Trifluorbenzimidazolribosid - 3',5'-cyclophosphat |
| 8-Cl-cAMPS               | 8-Chloradenosin - 3',5'-cyclothiophosphat           |
| 8-Cl-cGMP                | 8-Chlorguanosin - 3',5'-cyclophosphat               |
| 8-Cl-cGMPS               | 8-Chlorguanosin - 3',5'-cyclothiophosphat           |
| cGMP                     | Guanosin - 3',5'-cyclophosphat                      |
| cGMPS                    | Guanosin - 3',5'-cyclothiophosphat                  |
| cIMP                     | Inosin - 3',5'-cyclophosphat                        |
| 8-I-cGMP                 | 8-Iodguanosin - 3',5'-cyclophosphat                 |
| 2-NH <sub>2</sub> -cPuMP | 2-Aminopurinribosid - 3',5'-cyclophosphat           |
| cPuMP                    | Purinribosid - 3',5'-cyclophosphat                  |
| 6-SH-cGMP                | 6-Mercaptoguanosin - 3',5'-cyclophosphat            |

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                        | Seite    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Zusammenfassung</b>                                                              | <b>1</b> |
| <b>2. Einführung</b>                                                                   |          |
| 2.1. cGMP als „second messenger“                                                       | 3        |
| 2.2. Die cGMP-abhängige Proteinkinase                                                  | 5        |
| 2.3. Zielsetzung                                                                       | 7        |
| <b>3. Theoretischer Teil</b>                                                           |          |
| 3.1. Cyclophosphorylierung mit $\text{POCl}_3$ und $\text{PSCl}_3$                     | 13       |
| 3.2. Darstellung von 8-Bromguanosin-3',5'-cyclophosphat (3)                            | 15       |
| 3.3. Darstellung von 8-Chlorguanosin-3',5'-cyclophosphat (2)                           | 16       |
| 3.4. Darstellung von 8-Iodguanosin-3',5'-cyclophosphat (4)                             | 17       |
| 3.4.1. Synthese von 8-Iodguanosin (16)                                                 | 17       |
| 3.4.2. Synthese von 8-Iodguanosin-3',5'-cyclophosphat (4)                              | 19       |
| 3.5. Darstellung von 6-Mercaptoguanosin-3',5'-cyclophosphat (5)                        | 19       |
| 3.6. Darstellung von Inosin-3',5'-cyclophosphat (6)                                    | 19       |
| 3.7. Darstellung von 2-Aminopurinribosid-3',5'-cyclophosphat (7)                       | 19       |
| 3.7.1. Synthese von 2-Aminopurinribosid (17)                                           | 19       |
| 3.7.2. Synthese von 2-Aminopurinribosid-3',5'-cyclophosphat (7)                        | 20       |
| 3.8. Darstellung von Purinribosid-3',5'-cyclophosphat (8)                              | 21       |
| 3.9. Darstellung von 2-Trifluormethyl-benzimidazolribosid-3',5'-cyclophosphat (9)      | 21       |
| 3.9.1. Synthesestrategie zur Darstellung von 2-Trifluormethyl-benzimidazolribosid (23) | 21       |
| 3.9.2. Synthese von 2-Trifluormethyl-benzimidazol (19)                                 | 22       |
| 3.9.3. Synthese von 2-Trifluormethyl-benzimidazolribosid (23)                          | 22       |
| 3.9.4. Synthese von 2-Trifluormethyl-benzimidazolribosid-3',5'-cyclophosphat (9)       | 25       |
| 3.10. Darstellung von (Rp)- und (Sp)-8-Chlorguanosin-3',5'-cyclophosphat (12), (13)    | 26       |

|         |                                                                                                   |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.11.   | Versuche zur Darstellung von 8-Fluorguanosin - 3',5' -<br>cyclophosphat (1)                       | 28 |
| 3.11.1. | Syntheseversuche mit KF/18-Krone-6                                                                | 28 |
| 3.11.2. | Syntheseversuch mit KF/CaF <sub>2</sub>                                                           | 30 |
| 3.11.3. | Syntheseversuche mit TASF                                                                         | 30 |
| 3.11.4. | Syntheseversuch nach der Balz-Schiemann Reaktion                                                  | 32 |
| 3.12.   | Spektroskopische Methoden                                                                         | 34 |
| 3.12.1. | UV-Spektroskopie                                                                                  | 34 |
| 3.12.2. | <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie                                                                  | 35 |
| 3.12.3. | <sup>31</sup> P-NMR-Spektroskopie                                                                 | 37 |
| 3.12.4. | FAB-MS-Spektrometrie                                                                              | 38 |
| 3.13.   | Aufklärung von Nebenprodukten                                                                     | 40 |
| 3.13.1. | Nucleosid-5'-phosphate IV                                                                         | 40 |
| 3.13.2. | Nucleosid-diphosphate                                                                             | 41 |
| 3.13.3. | 5'-Chlornucleoside V                                                                              | 44 |
| 3.13.4. | Nucleobasen                                                                                       | 44 |
| 4.      | <b>Der log k'<sub>w</sub> - Wert</b>                                                              |    |
| 4.1.    | Theoretische Grundlagen                                                                           | 46 |
| 4.2.    | Diskussion der Ergebnisse                                                                         | 47 |
| 5.      | <b>Untersuchungen zur Substratspezifität der Calmodulin-<br/>abhängigen Phosphodiesterase</b>     |    |
| 5.1.    | Einführung                                                                                        | 51 |
| 5.2.    | Diskussion der Ergebnisse                                                                         | 51 |
| 6.      | <b>Studien zur Charakterisierung der Bindungsstellen in<br/>der cGMP-abhängigen Proteinkinase</b> |    |
| 6.1.    | Einführung                                                                                        | 55 |
| 6.2.    | Diskussion der Ergebnisse                                                                         | 56 |
| 6.3.    | Überlegungen zu einem Bindungsmodell                                                              | 64 |
| 7.      | <b>Ausblick</b>                                                                                   | 68 |

|           |                                                                                                              |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>8.</b> | <b>Experimenteller Teil</b>                                                                                  |    |
| 8.1.      | Allgemeine Versuchsbedingungen                                                                               | 69 |
| 8.1.1.    | Chemikalien und Lösungsmittel                                                                                | 69 |
| 8.1.2.    | Chromatographische Methoden                                                                                  | 69 |
| 8.1.3.    | Spektroskopische Methoden                                                                                    | 70 |
| 8.1.4.    | Weitere Arbeitsmethoden                                                                                      | 70 |
| 8.1.5.    | Computer-Programme                                                                                           | 70 |
| 8.2.      | Synthese von 8-Bromguanosin-3',5'-cyclophosphat (3)                                                          | 71 |
| 8.2.1.    | 8-Bromguanin                                                                                                 | 72 |
| 8.2.2.    | 8-Bromguanosin-5'-phosphat                                                                                   | 72 |
| 8.3.      | Synthese von 8-Chlorguanosin-3',5'-cyclophosphat (2)                                                         | 73 |
| 8.3.1.    | 8-Chlorguanosin-5'-phosphat                                                                                  | 74 |
| 8.4.      | Synthese von 8-Mercaptoguanosin (15)                                                                         | 74 |
| 8.5.      | Synthese von 8-Iodguanosin (16)                                                                              | 75 |
| 8.6.      | Synthese von 8-Iodguanosin-3',5'-cyclophosphat (4)                                                           | 75 |
| 8.6.1.    | 8-Iodguanosin-5'-phosphat                                                                                    | 76 |
| 8.7.      | Synthese von 6-Mercaptoguanosin-3',5'-cyclophosphat (5)                                                      | 77 |
| 8.7.1.    | 6-Mercaptoguanosin-5'-phosphat                                                                               | 78 |
| 8.7.2.    | 5'-Chlor-6-mercaptopguanosin                                                                                 | 78 |
| 8.8.      | Synthese von Inosin-3',5'-cyclophosphat (6)                                                                  | 79 |
| 8.8.1.    | Inosin-5'-phosphat                                                                                           | 80 |
| 8.8.2.    | 5'-Chlorinosin                                                                                               | 80 |
| 8.9.      | Synthese von 2-Aminopurinribosid (17)                                                                        | 81 |
| 8.10.     | Synthese von 2-Aminopurinribosid-3',5'-cyclophosphat (7)                                                     | 81 |
| 8.10.1.   | 2-Aminopurinribosid-5'-phosphat                                                                              | 82 |
| 8.11.     | Synthese von Purinribosid-3',5'-cyclophosphat (8)                                                            | 83 |
| 8.12.     | Synthese von 2-CF <sub>3</sub> -Benzimidazol (19)                                                            | 84 |
| 8.13.     | Synthese von 2-CF <sub>3</sub> -Benzimidazolribosid-2',3',5'-tri-O-benzoat (22) (Silylierung, Ribosidierung) | 85 |
| 8.14.     | Synthese von 2-CF <sub>3</sub> -Benzimidazolribosid (23)                                                     | 86 |
| 8.15.     | Synthese von 2-CF <sub>3</sub> -Benzimidazolribosid-3',5'-cyclophosphat (9)                                  | 86 |
| 8.16.     | Synthese von (Rp)- und (Sp)-8-Chlorguanosin-3',5'-cyclothiophosphat (12), (13)                               | 87 |
| 8.17.     | Synthese von 8-Aminoguanosin (28)                                                                            | 89 |

|            |                                       |     |
|------------|---------------------------------------|-----|
| <b>9.</b>  | <b>Enzymatische Untersuchungen</b>    |     |
| 9.1.       | Enzyme und Materialien                | 92  |
| 9.2.       | Cyclophosphodiesterase - Assay        | 92  |
| 9.3.       | cGMP-abhängiger Proteinkinase - Assay | 93  |
| 9.3.1.     | Aktivierungskurven                    | 94  |
| <b>10.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>           | 103 |

### **Danksagung**

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese ausgewählter Cyclo-nucleotid- und Cyclothionucleotid-Analoga. Mit ihnen sollten die Bindungsstellen in der cGMP- abhängigen Proteinkinase charakterisiert werden. Die Ergebnisse aus diesen biochemischen Untersuchungen werden diskutiert.

Die Darstellung der Verbindungen gelang nach einer in der Arbeitsgruppe entwickelten Cyclisierungsmethode. Dazu wurden die ungeschützten Nucleoside in Triethylphosphat gelöst, mit  $\text{POCl}_3$  oder  $\text{PSCl}_3$  selektiv in 5'-Position phosphoryliert und anschließend durch eine kontrollierte Hydrolyse in alkalischer Lösung cyclisiert. Die Reaktion war auf alle Nucleoside anwendbar.

Die Ausgangsverbindungen für die Cyclisierung konnten über Literaturvorschriften dargestellt werden.

Für die Synthese des 8-Chlorguanosin wurde eine neue und einfache Methode mit Phosphorylchlorid als Reagenz entwickelt.

Die Darstellung von 8-Fluorguanosin (28) aus 8-Bromguanosin (14) durch Substitution mit  $\text{KF/CaF}$ ,  $\text{KF/18-Krone-6}$  oder TASF (27) sowie in einer Schiemann-Reaktion gelang dagegen nicht.

Die Isolierung und Reinigung der Derivate erfolgte über Flash-Chromatographie. Dabei konnten für die Cyclisierung typische Nebenprodukte wie z.B. Nucleosid-5'-Phosphat IV abgetrennt und aufgeklärt werden, die Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der Methode gaben.

Alle dargestellten Verbindungen wurden über UV-, NMR- und FAB-MS-Spektroskopie charakterisiert.

Durch die Messung des  $\log k_w$  -Wertes konnte die relative Lipophilie der einzelnen Derivate bestimmt werden, die eine Abschätzung der Zellmembranpermeabilität zuläßt. So steigt durch die Schwefelsubstitution am Phosphatring die Lipophilie, wobei die (Rp)-Isomeren die

höheren Werte aufweisen. Die Reduzierung des Wasserstoffbrückenpotentials am cGMP führt ebenfalls zu einer Lipophiliesteigerung.

Nach Abschluß der synthetischen Arbeiten wurden alle Cyclophosphate und Cyclothiophosphate in einer orientierenden enzymatischen Untersuchung auf ihre Abbaubarkeit durch eine Calmodulin-abhängige Cyclophosphodiesterase untersucht.

Danach nimmt die Abbaurate mit steigendem Radius der Substituenten in Position 8 ab. Alle (Rp)-Diastereomeren sind hydrolysestabil. Aus den Werten für die funktionsreduzierten Verbindungen läßt sich schließen, daß die Base über Dipol-induzierte Dipol-Wechselwirkungen gebunden wird.

In einer zweiten Studie wurde die Aktivierung einer cGMP-abhängigen Proteinkinase durch die dargestellten Derivate getestet, um Rückschlüsse auf die Bindungsstellen im Enzym ziehen zu können.

Nach den erhaltenen Daten wird cGMP, zusätzlich zu den schon bekannten Ladungsinteraktionen am Phosphatring und den Wasserstoffbrückenbindungen zur 2'-OH, 3'-O und 5'-O-Position, über eine Dipol-Dipol- Wechselwirkung an der Base und einer H-Brücken-Bindung zur 2-NH<sub>2</sub>- Funktion aktiviert. Die 6-Oxo-Gruppe scheint keine molekulare Wechselwirkung einzugehen.

Abschließend werden Theorien zur Differenzierung zwischen cAMP und cGMP sowie zur site-Selektivität entwickelt und ein Bindungsmodell vorgestellt.



Der Prozess der Signalumwandlung in der Zelle wird in Abb. 2 verdeutlicht.

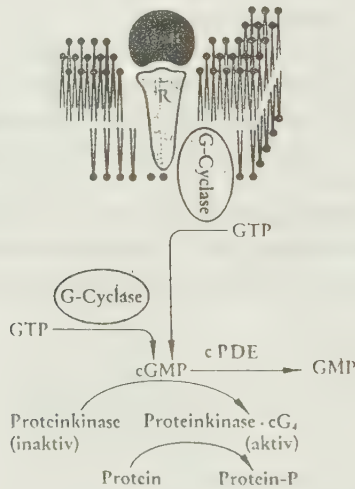


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signalumwandlung in der Zelle <sup>16)</sup>

Durch Wechselwirkung von Hormonen und Neurotransmittern mit zellmembrangebundenen Rezeptoren (R) wird entweder eine membranständige oder eine intrazelluläre (lösliche) Guanylatcyclase (GC) aktiviert <sup>14)</sup>, die Guanosin-5'-triphosphat (GTP) in cGMP umwandelt. cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase, die durch Phosphorylierung von spezifischen Proteinen die jeweilige Zellreaktion auf die Stimulation des Rezeptors auslöst. Die Regulierung des Signalweges erfolgt über die Hydrolyse von cGMP zu Guanosin-5'-monophosphat (GMP) durch gewebespezifische Cyclophosphodiesterasen (cPDE) <sup>15)</sup>.

Ein zweiter Weg der Signalübertragung mit cGMP als „second messenger“ konnte in der Retina aufgeklärt werden (Abb. 3).

Im Stäbchenaußensegment des Auges wird durch direkte Bindung von cGMP der Natriumkanal offengehalten. Die Anregung des Rhodopsins

(R) durch Licht stimuliert über das Protein Transducin (T) die Aktivität einer cGMP-spaltenden Phosphodiesterase (PDE). Die Erniedrigung der cGMP-Konzentration führt zur Schließung der Natriumkanäle <sup>17)</sup>. Dieser Mechanismus wird auch für die Regulierung von cGMP-PDE durch NGF in PC 12 - Zellen diskutiert <sup>7)</sup>.

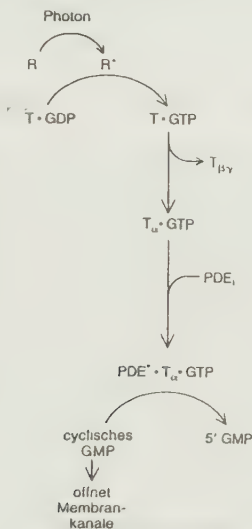


Abb.3: Schematische Darstellung der Sehkaskade im Auge <sup>18)</sup>

## 2.2. Die cGMP-abhängige Proteinkinase

Es sind bisher drei unterschiedliche cGMP-abhängige Proteinkinasen isoliert worden - die cGMP-abhängige Proteinkinase aus der Rinderlunge (Typ Iα), <sup>19,20)</sup> die cGMP-abhängige Proteinkinase aus Darmzotten (Typ II) <sup>21)</sup> und eine cGMP-abhängige Proteinkinase aus der Rinderaorta (Typ Iβ) <sup>22)</sup>.

Ich werde mich in dieser Arbeit auf die cG-Kinase aus Rinderlunge beschränken, da mir diese während meiner kinetischen Messungen zur Verfügung stand.

Die cGMP-abhängige Proteinkinase besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit je 670 Aminosäuren ( $M = 76.331$ ) <sup>23)</sup>. Jede Untereinheit enthält eine regulatorische und eine katalytische Seite. Bei der cA-Kinase, einem homologen Holoenzym, liegen die regulatorischen und katalytischen Untereinheiten auf unterschiedlichen Polypeptidketten <sup>24)</sup>.

Die cG-Kinase wird durch die Bindung von 4 Mol cGMP aktiviert,



wobei je 2 Mol cGMP pro Untereinheit gebunden werden; eins an die slow-site (site B, site-1) und das zweite an die rapid-site (site A, site-2) <sup>25)</sup>. Dabei dissoziiert das Enzym, im Gegensatz zur cA-Kinase <sup>24)</sup>, nicht in seine zwei Untereinheiten. Trennt man beide Untereinheiten, wird die cG-Kinase trotz gebundener cGMP-Moleküle inaktiviert.

Bei niedrigen Konzentrationen bindet cGMP nur an die slow-site. Bei vollständiger Besetzung aller slow-sites kommt es im Molekül zu einer allosterischen Konformationsänderung und zu einer 50 % Aktivierung. Durch die Strukturänderung werden neg. Ladungen in bestimmten Enzymabschnitten freigelegt oder pos. Ladungen maskiert <sup>26)</sup>. Die Bindung von cGMP an beide B-sites stimuliert die Bindung von cGMP an die rapid-site.

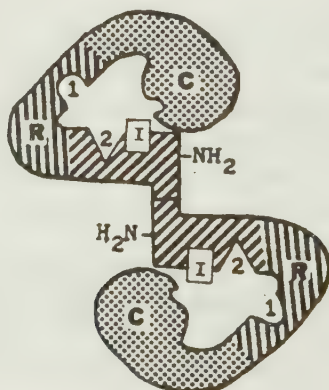


Abb. 4 : Modell der cGMP-abhängigen Proteinkinase <sup>22)</sup>

Eine „voraktivierte“ Form der cG-Kinase mit halbmaximaler Besetzung nur der slow-sites konnte aus Gewebe isoliert werden und scheint eine physiologische Rolle zu spielen <sup>26)</sup>.

Die cGMP-abhängige Proteinkinase kann sowohl Serin als auch Threonin phosphorylieren. Bei Zugabe von MgATP und in Abwesenheit von cGMP wurde Autophosphorylierung beobachtet <sup>27)</sup>.

### 2.3. Zielsetzung

Aufgrund der potentiellen pharmakologischen Bedeutung von cAMP-Analoga wurden in den letzten Jahren eine Reihe von cAMP Derivaten auf ihre Bindung und Aktivierung an den cAMP-abhängigen Proteinkinasen Typ I und Typ II untersucht <sup>28-30)</sup>. Die Aufklärung der für die Bindung essentiellen funktionellen Gruppen im cAMP-Molekül <sup>31)</sup>, die Entdeckung des ersten cA-Kinase Antagonisten-(Rp)-cAMPS <sup>32,33)</sup> sowie die Ableitung eines Computermodells für die Tertiärstruktur der site B — Bindungsstellen im Enzym <sup>34)</sup> führten zu einer umfassenden Bindungsmodellstudie <sup>35)</sup>.

Im Gegensatz dazu gibt es bisher nur eine Veröffentlichung zur Charakterisierung der Bindungsstellen für die cGMP-abhängige Proteinkinase, in der Cyclonucleotid-Analoga auf ihre site-Selektivität und Aktivität untersucht wurden <sup>36)</sup>.

Danach sind sowohl eine neg. Ladung in der Phosphatregion als auch die Wechselwirkung beider Bindungsstellen mit der 2'-OH-Gruppe, 3'-O und 5'-O an der Ribose essentiell für die Stimulierung der cG-Kinase. Modifikationen an der Base zeigten, daß N<sup>7</sup> keinen Einfluß auf die Aktivierung des Enzyms hat. Die Substitution des Protons an N<sup>1</sup> führte nur zu einer geringen Reduzierung der Affinität an der site-1 und scheint keine wichtige Wechselwirkung auszubilden. Bei der Substitution der 6-Oxo-Gruppe durch eine Aminofunktion kam es dagegen zu einem drastischen Bindungsrückgang an beiden Seiten. Auch Veränderungen an der Aminogruppe in Position 2 hatten eine Reduzierung der Aktivität zur Folge, die auf Wasserstoffbrückenbindungen

mit der Bindungsstelle schließen läßt. Offen blieb dagegen der Einfluß von Substituenten in Position 8 und die Frage nach einem Antagonisten für die cGMP-abhängige Proteinkinase.

Auf der Grundlage des Test-Kit-Konzepts von B. Jastorff <sup>37)</sup>, daß eine systematische Reduzierung von molekularen Wechselwirkungen unter gleichzeitiger Berücksichtigung der dadurch bedingten physikalisch-chemischen Veränderungen im Molekül, sollte in dieser Arbeit anhand ausgewählter cGMP-Analoga der Einfluß verschiedener Wechselwirkungsmöglichkeiten des cGMP mit der Bindungsstelle zur Aktivierung der cG-Kinase untersucht werden. Zur Auswahl einzelner Verbindungen wurden zusätzlich die Daten aus semi-empirischen MNDO-Berechnungen herangezogen <sup>38)</sup>.

#### a) Einfluß von Substituenten in Position 8

Øgreid et al. <sup>36)</sup> konnten zeigen, daß 8-Brom-cGMP die Aktivität der cG-Kinase im Vergleich zu cGMP um den Faktor 4 steigert.

Um den Einfluß der Größe, Hydrophobie und der Elektronegativität von Substituenten in Position 8 zu untersuchen, sollten 8-Fluor-(1), 8-Chlor-(2), 8-Brom-(3) und 8-Iodguanosin-3',5'-cyclophosphat (4) synthetisiert werden.

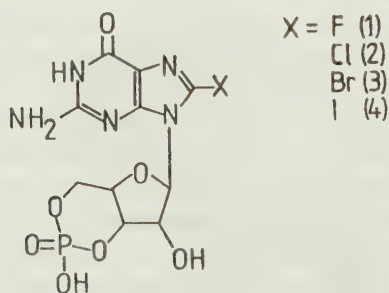
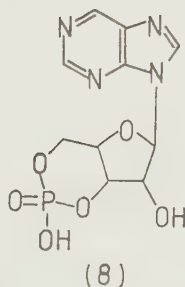
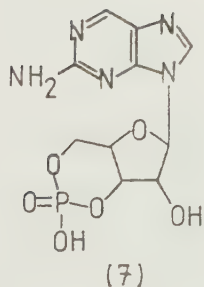
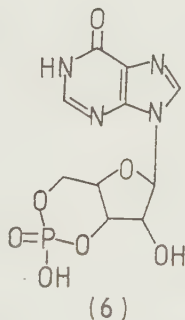
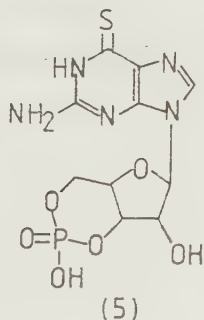


Abb.5: Struktur von 8-F-(1), 8-Cl-(2), 8-Br-(3) und 8-I-cGMP (4)

### b) Einfluß von Wasserstoffbrückenbindungen

Durch selektive Reduzierung der Wasserstoffbrückenbindungspotentiale im cGMP kann die Wichtigkeit der 6-Oxo- und der 2-Aminogruppe zur Stimulierung der cG-Kinase überprüft werden.

Dazu sollten die Verbindungen 6-Mercaptoguanosin - (5), Inosin - (6), 2-Aminopurinribosid - (7) und Purinribosid - 3',5'-cyclophosphat (8) hergestellt werden.



**Abb.6: Struktur von 6-SH-cGMP (5), cIMP (6), 2-NH<sub>2</sub>-cPuMP (7) und cPuMP (8)**

### c) Einfluß des Dipolmomentes der Base

Um die Möglichkeit einer Bindung der Base nur über die Richtung und/ oder Stärke des Dipolmomentes mit entsprechenden Aminosäuren in der Polypeptidkette zu testen, wurde die Verbindung 2-Trifluor-methylbenzimidazolribosid -3',5'-cyclophosphat (**9**) ausgewählt, deren Basen-Dipolmomentsrichtung dem des Guanin sehr nahe kommt (Abb.8), aber keine Wasserstoffbrückenbindungsmöglichkeiten im Sechsring aufweist.

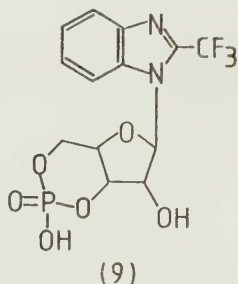


Abb.7: Struktur von 2- $\text{CF}_3$ -cBiMP (**9**)

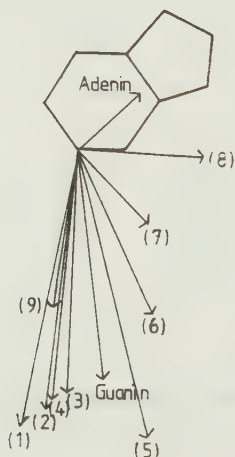
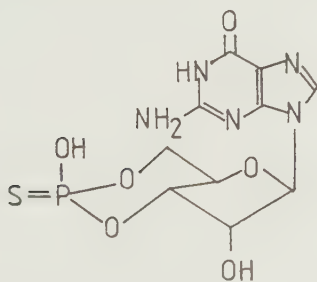


Abb.8 : Dipolmomente ausgewählter Nucleobasen

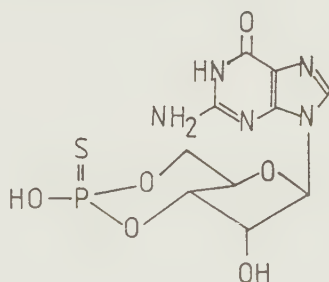
#### d) Suche nach einem Antagonisten

Die equatoriale Stellung des exocyclischen Schwefelatoms im (Rp)-cAMPS ist die entscheidende strukturelle Veränderung im Derivat, die den antagonistischen Effekt an der cA-Kinase zur Folge hat <sup>39,40</sup>.

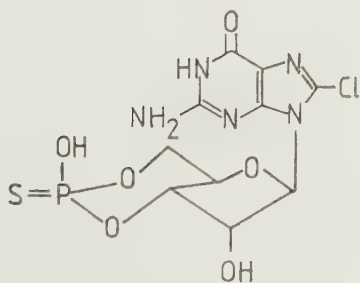
Um dieses Bindungsmodell auch an der cGMP-abhängigen Proteinkinase zu überprüfen, sollten zwei entsprechende Diastereomerenpaare auf ihre Hemmung getestet werden. (Rp)- (10) und (Sp)-Guanosin-3',5'-cyclothiophosphat (11) standen dafür bereits aus einer früheren Synthese zur Verfügung <sup>41</sup>. Als zweites Isomerenpaar wurden (Rp) - (12) und (Sp)-8-Chlorguanosin-3',5'-cyclothiophosphat (13) ausgewählt.



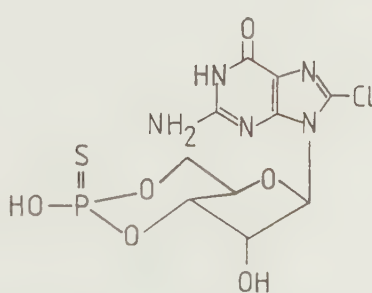
(10)



(11)



(12)



(13)

Abb.9: Struktur von cGMPS (10,11) und 8-Cl-cGMPS (12,13)

Zusätzlich zu den enzymatischen Arbeiten an der cGMP-abhängigen Proteinkinase sollte in dieser Arbeit eine orientierende Untersuchung zur Metabolisierung der synthetisierten Verbindungen mit einer Cyclo-nucleotidphosphodiesterase aus Rinderherz durchgeführt werden, um eine Aussage über die Abbaubarkeit in der Zelle machen zu können. Außerdem sollte die Lipophilie der einzelnen Substanzen durch die Messung des  $\log k'_w$  - Wertes bestimmt werden, die eine Abschätzung der Zellmembranpermeabilität zuläßt.

### 3. THEORETISCHER TEIL

#### 3.1. Cyclophosphorylierung mit $\text{POCl}_3$ und $\text{PSCl}_3$

Bei der Synthese der Derivate wurde die in unserer Arbeitsgruppe neu entwickelte Methode zur Darstellung von Cyclophosphaten und Cyclothiophosphaten aus ungeschützten Nucleosiden angewendet <sup>42,43</sup>.

Im Gegensatz zu den bisherigen Cyclophosphorylierungsverfahren <sup>44,45</sup> und Reaktionen zur Synthese von Cyclothiophosphaten <sup>46-50</sup> sind die Nucleotide mit der neuen Methode leichter und schneller synthetisierbar bzw. wird die Darstellung sehr lipophiler Cyclothiophosphate erst möglich.

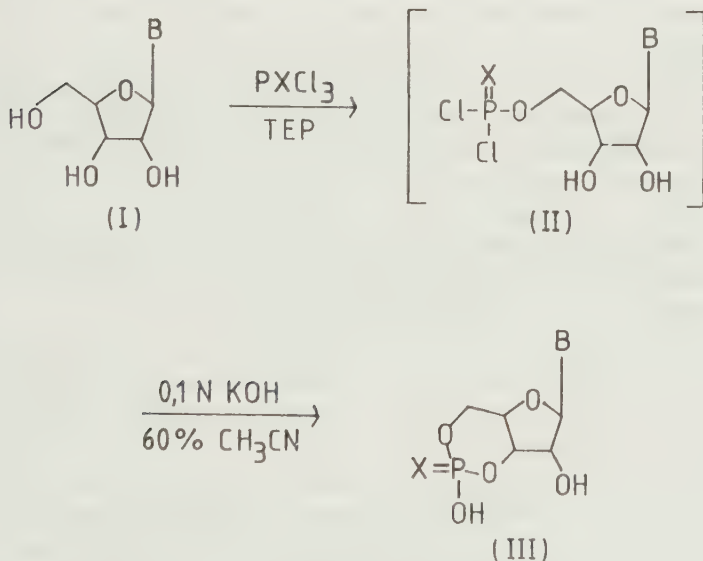


Abb.10: Cyclophosphorylierung mit  $\text{PXCl}_3$  ( $\text{X} = \text{O}, \text{S}$ )

Für die Reaktion muß das Nucleosid **I** getrocknet werden, da der erste Reaktionsschritt, die Phosphorylierung der prim. Hydroxygruppe an der Ribose, sehr hydrolyseempfindlich ist. Das Nucleosid (**I**) wird in 1 ml Triethylphosphat pro 0,1 mMol gelöst und mit 2,2 Äquivalenten Phosphorylchlorid bzw. Thiophosphorylchlorid versetzt. Aufgrund der höheren Reaktivität des  $\text{POCl}_3$  muß der Reaktionsansatz auf  $0^\circ \text{C}$  abgekühlt werden, um Nebenreaktionen mit den sek. 2'- und 3'-Hydroxygruppen zurückzudrängen. Die Reaktion mit  $\text{PSCl}_3$  läuft bei RT ab. Es bildet sich die hydrolyselabile und bisher nicht isolierte Zwischenstufe 5'-Dichlorphosphat **II**.

Nach Beendigung der Phosphorylierung tropft man die Reaktionslösung innerhalb von 30 Sek. in eine 0,1 N KOH-Lösung, die 60 % an Acetonitril ist (12 ml pro 0,1 mMol Nucleosid). Dabei wird bei der Cyclophosphorylierung bei RT gearbeitet, während für die Cyclothiophosphorylierung die Reaktionslösung unter Rückfluß zugetropft werden muß. Beide Ansätze werden im Eisbad abgekühlt und sofort mit 6 N HCl neutralisiert.

Bei der Cyclisierung handelt es sich um eine Kondensation zwischen der 3'-Hydroxygruppe und dem Dichlorphosphat. Der hohe Anteil des polaren, aprotischen Lösungsmittels Acetonitril begünstigt diese intramolekulare Reaktion.

Neben den Cyclophosphaten entstehen, je nach Reaktivität der eingesetzten Edukte, weitere, für die Methode spezifische Verbindungen, die in Abschnitt 3.13. näher beschrieben werden.

### 3.2. Darstellung von 8-Bromguanosin-3',5'-cyclophosphat (3)

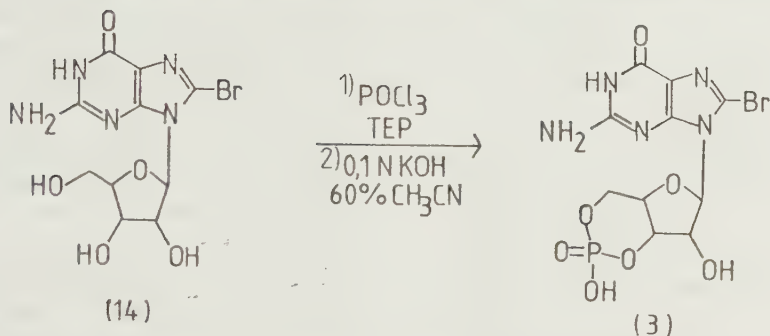


Abb.11: Reaktionsschema zur Synthese von 8-Br-cGMP (3)

Nach der unter 3.1. beschriebenen allgemeinen Methode der Cyclophosphorylierung wurde 8-Bromguanosin (14) in TEP gelöst und unter Eiskühlung mit 2,2 Äquivalenten POCl<sub>3</sub> versetzt. Nach Beendigung der Cyclisierungsreaktion zeigte das HPLC-Chromatogramm der Reaktionskontrolle zwei neue Signale, die nach der Aufarbeitung und Trennung des Reaktionsansatzes durch spektroskopische Methoden als 8-Cl-cGMP(2) und 8-Br-cGMP (3) identifiziert wurden (Abb.12 a).

Um die Bildung des Produktes 8-Cl-cGMP (2) zurückzudrängen, wurde die Menge des Lösungsmittels TEP verdoppelt und die Zugabe von POCl<sub>3</sub> über 1 Std. verteilt. Dadurch konnte die Ausbeute an 8-Br-cGMP (3) deutlich gesteigert werden (Abb. 12 b).

Bei der Reaktion mit POCl<sub>3</sub> kommt es in einer Parallelreaktion zu einer nucleophilen Substitution des Broms durch Chlor.

Um den Austausch zu beweisen, wurden 0,1 µMol 8-Br-cGMP (3) mit 0,6 µMol POCl<sub>3</sub> versetzt. In der HPLC-Kontrolle war deutlich die Abnahme des 8-Br-cGMP - Signals zu beobachten, während das Signal für 8-Cl-cGMP in gleichem Maße zunahm.

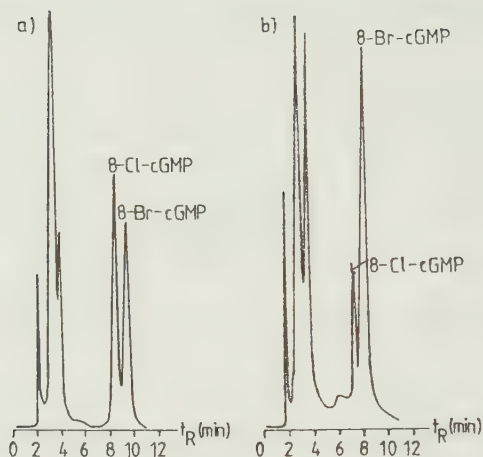


Abb.12 : HPLC – Chromatogramm der Reaktionslösung a) vor der Optimierung, b) nach der Optimierung

### 3.3. Darstellung von 8-Chlorguanosin-3',5'-cyclophosphat (2)

Für die Darstellung von 8-Chlorpurin-Nucleosiden existierten bislang vier mehr oder weniger aufwendige Synthesewege :

- a) die Umsetzung von Adenosin mit  $(n-C_4H_9)_4NJCl_4$  <sup>51)</sup>
- b) die Reaktion von 8-Mercaptoadenosin in konz. HCl bei  $-20^\circ C$  mit  $Cl_2$ -Gas <sup>52)</sup>
- c) die Umsetzung von Adenosin oder Guanosin mit m-Chlorperbenzoesäure <sup>53)</sup>
- d) und die Reaktion von 2',3',5'-geschütztem Adenosin mit  $LiN(CHMe_2)_2$  und anschließender Umsetzung mit Tosylchlorid <sup>54)</sup>

Aufgrund der Ergebnisse bei der Synthese von 8-Br-cGMP (3), bei der sich 8-Cl-cGMP (2) als zweites Hauptprodukt durch die nucleophile Substitution von Brom durch Chlor bildete, wurde versucht, diese Reaktion zu optimieren, anstatt nach einem der oben aufgeführten Synthesewege vorzugehen.

Durch Konzentrierung der Reaktionslösung auf das halbe Volumen, die vermehrte Zugabe von  $\text{POCl}_3$  (3,3 Äquivalent) und eine Verlängerung der Phosphorylierungszeit auf 5 Std. konnte die Ausbeute an 8-Cl-cGMP (2) deutlich gesteigert werden. Eine Substitution der 6-Oxogruppe wurde nicht beobachtet.

Nach der Trennung des Reaktionsansatzes über Flash-Chromatographie wurde 8-Chlorguanosin-3',5'-cyclophosphat (2) durch UV-,  $^{31}\text{P}$ -NMR-,  $^1\text{H}$ -NMR- und FAB-MS-Spektroskopie charakterisiert.

Das bei der Reinigung ebenfalls isolierte 8-Br-cGMP (3) konnte durch Zugabe von  $\text{POCl}_3$  „nachchloriert“ werden.

Die Übertragung dieser Methode zur Synthese von 8-Cl-cAMP aus 8-Bromadenosin war ebenfalls erfolgreich <sup>55)</sup>.

### 3.4. Darstellung von 8-Iodguanosin-3',5'-cyclophosphat (4)

#### 3.4.1. Synthese von 8-Iodguanosin (16)

Zu den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Iodierung von Nucleosiden und Nucleotiden in 8-Position gehören:

- a) die Reaktion von 8-Bromnucleosiden mit Thioharnstoff zur Mercapto-  
verbindung und anschließender Umsetzung mit  $\text{KI/I}_2$  zum entsprechenden 8-Iod-Derivat <sup>56,57)</sup> und
- b) die Umsetzung von Nucleosiden mit N-Iodsuccinimid <sup>58)</sup>.

Die Synthese von 8-Iodguanosin (16) wurde in Anlehnung an die Umsetzung von Holmes et al <sup>56)</sup> durchgeführt (Abb. 13).

8-Bromguanosin (14) wurde in Methanol suspendiert, mit 2 Äquivalenten Thioharnstoff versetzt und unter Rückfluß erhitzt. Der Schwefel wirkt in dieser  $\text{S}_{\text{N}2}$ -Reaktion als Nucleophil und das gebildete Salz wird leicht zum Thiol hydrolysiert. Die Reaktion wurde über HPLC verfolgt und war nach 6 Std. beendet.

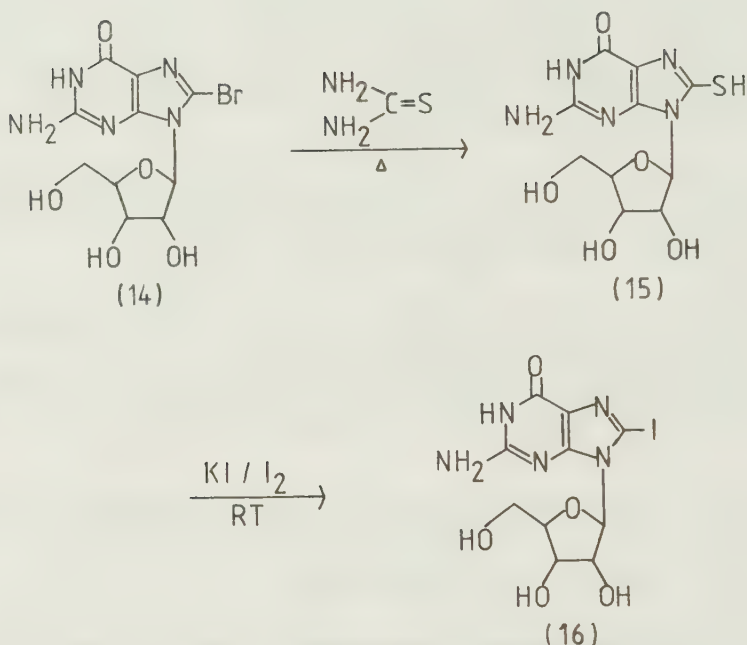


Abb.13: Reaktionsschema zur Synthese von 8-Iodguanosin (16)

Im UV-Spektrum der Verbindung sind die drei charakteristischen  $\lambda_{\text{max}}$  bei 296, 286 und 228 nm für 8-Mercaptoguanosin (13)<sup>58)</sup> zu sehen, das sich deutlich von der Ausgangsverbindung 8-Bromguanosin (12) mit  $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ <sup>56)</sup> unterscheidet (Abb. 24).

Für den zweiten Reaktionsschritt wurde 8-Mercaptoguanosin (15) in  $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert und mit 8 Äquivalenten Natriumcarbonat sowie 3,5 Äquivalenten  $\text{KI} / \text{I}_2$  versetzt. Die Umsetzung war entgegen der Literaturangabe (7 Tage) bereits nach 2 Std. beendet. Das Produkt wurde nach der Aufarbeitung über UV-Spektroskopie als 8-Iodguanosin (16) identifiziert.

### 3.4.2.     **Synthese von 8-Iodguanosin-3',5'-cyclophosphat (4)**

Die Umsetzung von 8-Iodguanosin (16) zum Cyclophosphat wurde erfolgreich in Analogie zu der unter 3.1. beschriebenen Cyclophosphorylierungsmethode durchgeführt.

Das Produkt konnte über UV-,  $^{31}\text{P}$ -NMR-,  $^1\text{H}$ -NMR- und FAB-MS eindeutig als 8-Iodguanosin-3',5'-cyclophosphat (4) charakterisiert werden.

### 3.5.       **Darstellung von 6-Mercaptoguanosin-3',5'-cyclophosphat (5)**

Die Synthese von 6-Mercaptoguanosin-3',5'-cyclophosphat (5) aus 6-Mercaptoguanosin (18) nach der Cyclisierungsmethode in Abschnitt 3.1. war nach 1 Std. beendet. Das Produkt konnte hochrein über Flash - Chromatographie abgetrennt und durch UV-,  $^{31}\text{P}$ -NMR-,  $^1\text{H}$ -NMR und FAB-MS als 6-SH-cGMP (5) charakterisiert werden.

### 3.6.       **Darstellung von Inosin-3',5'-cyclophosphat (6)**

Die Reaktion von Inosin mit Phosphorylchlorid in Triethylphosphat und anschließender Cyclisierung zum Inosin-3',5'-cyclophosphat (6) nach der unter 3.1. beschriebenen Methode gelang ohne Probleme. Die Verbindung konnte in hoher Reinheit flashchromatographisch isoliert und über spektroskopische Methoden charakterisiert werden.

### 3.7.       **Darstellung von 2-Aminopurinribosid-3',5'-cyclophosphat (7)**

#### 3.7.1.     **Synthese von 2-Aminopurinribosid (17)**

Für die Synthese von 2-Aminopurinribosid (17) existieren zwei mögliche Reaktionswege:

- a) die Chlorierung von 2',3',5'-geschütztem Guanosin mit  $\text{POCl}_3$  zum 6-Chlor-2-Aminopurinribosid <sup>59)</sup> und anschließender Hydrierung der 6-Position <sup>60)</sup> sowie

b) die Hydrierung von 6-Mercaptoguanosin mit Raney Nickel zum 2-Aminopurinribosid <sup>61)</sup>

Zur Darstellung des 2-Aminopurinribosids (17) wurde die Methode b nach Fox et al <sup>61)</sup> gewählt, da der Reaktionsweg kürzer ist (Abb. 14).

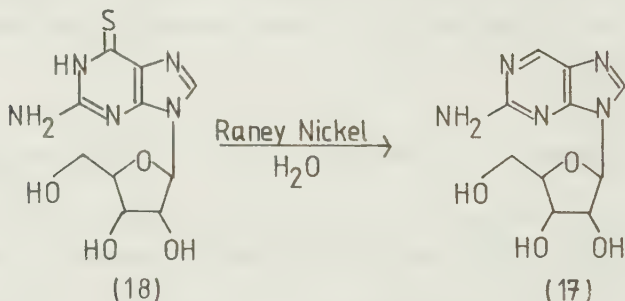


Abb.14 : Reaktionsschema zur Synthese von 2-Aminopurinribosid (17)

Der aktivierte Raney-Nickel - Katalysator wurde zu einer heißen Lösung von 6-Mercaptoguanosin (18) in siedendem H<sub>2</sub>O gegeben. Es setzte sofort eine heftige Reaktion ein. Die Umsetzung konnte über HPLC verfolgt werden und war nach 2 Std beendet. Das Nickel wurde über einen Cellulose-Filter abgetrennt, das Filtrat lyophilisiert und der so erhaltene Rückstand aus abs. Ethanol umkristallisiert. Die Charakterisierung des Produktes 2-Aminopurinribosid (18) erfolgte über UV- und FAB-MS-Spektroskopie.

### 3.7.2. Synthese von 2-Aminopurinribosid-3',5'-cyclophosphat (7)

Die weitere Umsetzung des 2-Aminopurinribosids (17) zum Cyclophosphat nach der unter 3.1. vorgestellten Methode war nach 2,5 Std. abgeschlossen. Das isolierte Produkt 2-Aminopurinribosid-3',5'-cyclophosphat (7) wurde über UV-, <sup>31</sup>P-NMR-, <sup>1</sup>H-NMR- und FAB-MS-Spektroskopie charakterisiert.

### 3.8.      **Darstellung von Purinribosid-3',5'-cyclophosphat (8)**

In Analogie zu der unter 3.1. beschriebenen Reaktion der Cyclophosphorylierung wurde Purinribosid zu Purinribosid-3',5'-cyclophosphat (8) umgesetzt. Die Reaktion wurde über HPLC verfolgt und war nach 1 Std. beendet. Nach der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes konnte das Produkt über Flash-Chromatographie isoliert und spektroskopisch analysiert werden.

### 3.9.      **Darstellung von 2-Trifluormethyl-benzimidazolribosid-3',5'-cyclophosphat (9)**

#### 3.9.1.    **Synthesestrategie zur Darstellung von 2-Trifluormethyl-benzimidazolribosid (23)**

Benzimidazole können als strukturelle Analoga von Purinen betrachtet werden und sind dadurch auch als Cyclonucleotide interessant. Im Gegensatz zu vielen Nucleosiden sind Benzimidazolriboside jedoch kaum käuflich erwerblich und müssen über eine Totalsynthese dargestellt werden.

Der erste Reaktionsschritt war in diesem Fall die Umsetzung von Trifluoressigsäure mit o-Phenylendiamin zum 2-CF<sub>3</sub>-Benzimidazol <sup>62)</sup> (19) (Abb. 15).

Die Darstellung des 2-CF<sub>3</sub>-Benzimidazolribosids (23) erfolgte nach einer neuen Methode von H. Vorbrüggen et al <sup>63,64)</sup>, in der die Base mit Hexamethyldisilazan silyliert und anschließend mit einer geschützten  $\beta$ -D-Ribofuranose zum geschützten Benzimidazolribosid umgesetzt und die Schutzgruppen abgespalten werden (Abb. 16). Die Synthese ist auch auf alle Purine und Pyrimidine anwendbar.

### 3.9.2. Synthese von 2-Trifluormethyl-benzimidazol (19)

Die Darstellung von 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazol wurde bereits 1928 von M.A. Phillips beschrieben <sup>62)</sup>.

Es handelt sich bei der Reaktion um eine säurekatalysierte Kondensation von Trifluoressigsäure mit o-Phenylendiamin <sup>65)</sup> (Abb. 15).

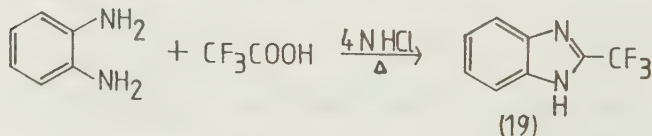


Abb.15 : Reaktionsschema zur Synthese von 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazol (19)

Für die Synthese von 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazol (19) wurden äquivalente Mengen an o-Phenylendiamin und Trifluoressigsäure in 4 N HCl unter Rückfluß erhitzt. Nach 1,5 Std. trat ein weißer, flockiger Niederschlag auf. Die Umsetzung wurde über HPLC verfolgt und war nach 3 Std. abgeschlossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und über UV- und EI-MS-Spektroskopie als 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazol (19) identifiziert.

Das Produkt ist ein Herbizid <sup>66,67)</sup> und sollte entsprechend vorsichtig gehandhabt werden.

### 3.9.3. Synthese von 2-Trifluormethyl-benzimidazolribosid (23)

#### Silylierung

Für die Synthese wurde 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazol in der 10 fachen Menge an Hexamethyldisilazan suspendiert und unter Rückfluß erhitzt. Das Ende der Reaktion wird durch das Auflösen der Substanz angezeigt <sup>66)</sup>. Nach 2 Std. war die Lösung immer noch trüb. Zur Beschleunigung der Silylierung wurde der Reaktionsansatz mit katalytischen Mengen (0,5 ml) Trimethylchlorsilan versetzt. Die Lösung klarte zwar auf, in der Kälte

fiel aber sofort wieder nicht umgesetztes 2-CF<sub>3</sub>-Benzimidazol (19) aus. Erst durch Zugabe äquivalenter Mengen an Trimethylchlorsilan konnte die Umsetzung vervollständigt werden.

Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abgezogen und der braune, sirupartige Rückstand ohne weitere Aufarbeitung unter N<sub>2</sub> aufbewahrt.

Das Produkt 2-Trifluormethyl-1-trimethylsilylbenzimidazol (20) ist hydrolyseempfindlich und zerfällt an der Luft sofort in seine Ausgangsverbindungen.

Wir vermuten, daß die Instabilität auf die hohe Acidität der NH-Gruppe an Position 1 zurückzuführen ist <sup>68,69</sup>.

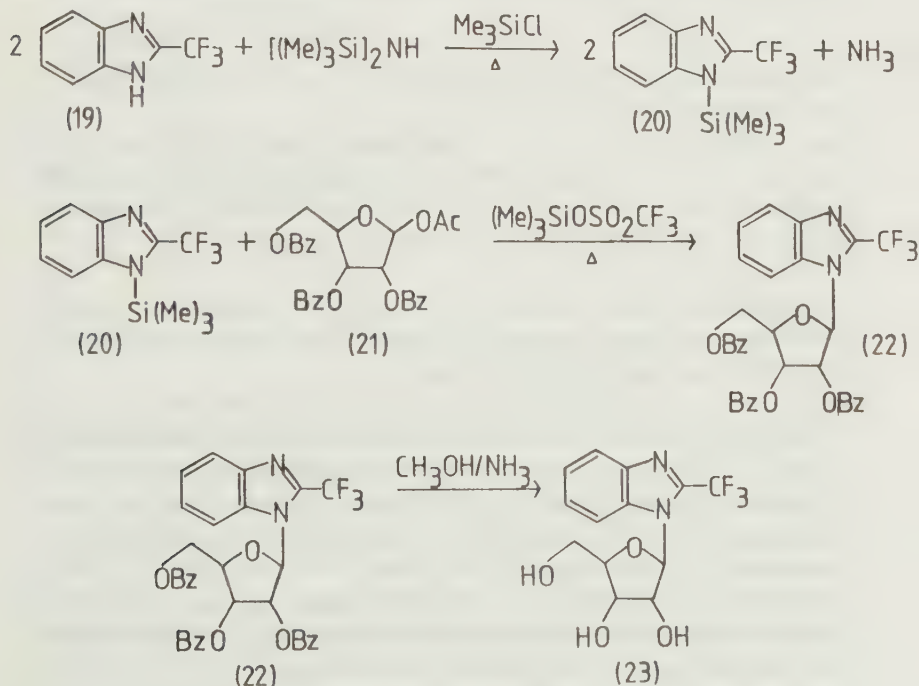


Abb.16: Reaktionsschema zur Synthese von 2-CF<sub>3</sub>-Benzimidazolribosid (23)

## Ribosidierung

Zur weiteren Umsetzung wurde das silylierte 2-Trifluormethylbenzimidazol (20) in trockenem 1,2-Dichlorethan gelöst, mit 1 Äquivalent 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranose (ABR) (21) und 1,2 Äquivalenten Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (Triflate) versetzt und unter Rückfluß und Schutzgasatmosphäre erhitzt. Die Reaktion konnte über HPLC verfolgt werden und war nach 3 Std. beendet. Nach der Aufarbeitung wurden die Schutzgruppen in einer mit Ammoniak gesättigten Methanollösung abgespalten und das Produkt über UV-,  $^{31}\text{P}$ -NMR-,  $^1\text{H}$ -NMR- und FAB-MS-Spektroskopie als 2-Trifluormethyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol (23) identifiziert.

Der Mechanismus der Ribosidierung wurde von H. Vorbrüggen und G. Häfle aufgeklärt <sup>69)</sup> (Abb. 17).

Im ersten Schritt überführt der Katalysator Triflate die Ribose in das stabile 1,2-Acyloxoniumsalz (24). Unter diesen Bedingungen kann die nucleophile silylierte Base (20) das Ribosekation (24) nur von oben angreifen. Es bildet sich ausschließlich die  $\beta$ -Konfiguration.

Die Konfigurationszuordnung der glycosidischen Bindung als 1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl- konnte anhand des Signals für das H-1'-Proton im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum getroffen werden.

Bei einer 1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-Bindung stehen die Protonen H-1' und H-2' trans zueinander. Das führt zu einer Hochfeldverschiebung des H-1' Signals ( $\delta = 5,90$ ) gegenüber der cis-Konfiguration des 1- $\alpha$ -D-Ribofuranosyls ( $\delta = 6,27$ ). Die Kopplungskonstante beträgt bei der trans-Anordnung 6,0 Hz, während die cis-Konfiguration eine Kopplungskonstante von 4,0 Hz aufweist <sup>69)</sup>.

Für 2-CF<sub>3</sub>-Benzimidazolribosid liegt das Signal für das H-1'-Proton bei  $\delta = 5,84$  ppm mit einer Kopplungskonstante von 7,5 Hz und beweist das Vorliegen der  $\beta$ -Konfiguration (siehe Tabelle 6).

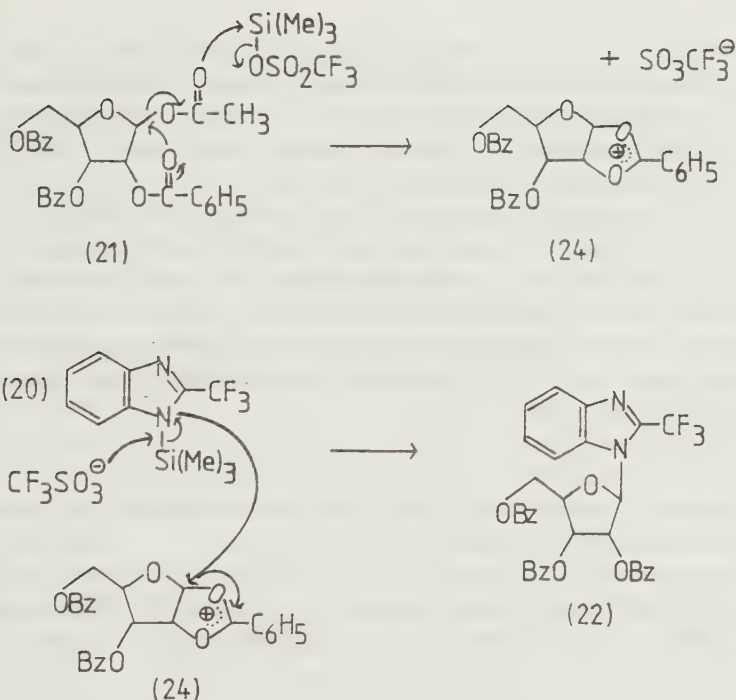


Abb.17: Mechanismus der Ribosidierung

### 3.9.4. Synthese von 2-Trifluormethyl-benzimidazol-3',5'-cyclophosphat (9)

Zur Darstellung von 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazol-3',5'-cyclophosphat (9) wurde 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazolribosid (23) entsprechend der Synthesevorschrift unter 3.1. in Triethylphosphat gelöst, mit 2,2 Äquivalenten Phosphorylchlorid versetzt und die Umsetzung über HPLC verfolgt.

Anstatt zur Phosphorylierung der 5'-Hydroxy-Gruppe an der Ribose kam es zur Spaltung der glycosidischen Bindung. Dies zeigt deutlich die bereits bei der Silylierung beobachtete Labilität der Bindung aufgrund der NH-Acidität an Position 1<sup>68,69</sup>.

Ein zweiter Grund für die geringe Reaktivität des Phosphorylierungsreagenzes könnte in dem Fehlen von nucleophilen Stickstoffatomen in der Base liegen, die durch Wechselwirkung mit  $\text{POCl}_3$  den Phosphor aktivieren und den nucleophilen Angriff des Sauerstoffs der prim. OH-Gruppe erst ermöglichen.

Diese Vermutung wird durch die Arbeit von U.Y. Miktals und I.R. Chasti unterstützt, die eine lineare Korrelation zwischen der Phosphorylierungsrate und den  $\text{pK}_a$ -Werten von Nucleosiden beobachtet haben <sup>70)</sup>.

Um die fehlende Aktivierung auszugleichen, wurde der Reaktionsansatz mit katalytischen Mengen an Pyridin versetzt. Die Umsetzung war nach 3 Std. beendet und die Spaltung der glycosidischen Bindung konnte stark zurückgedrängt werden.

Zum Entfernen des Pyridins wurde die Reaktionslösung vor der Aufarbeitung mehrmals zuerst mit Toluol und anschließend mit Methanol versetzt und wieder abrotiert.

Das Produkt 2-Trifluormethyl-benzimidazol-3',5'-cyclophosphat (9) konnte über Flash-Chromatographie isoliert und über UV-,  $^{31}\text{P}$ -NMR-,  $^1\text{H}$ -NMR- und FAB-MS-Spektroskopie charakterisiert werden

### 3.10. Darstellung von (Rp)- und (Sp)-8-Chlorguanosin-3',5'-cyclothiophosphat (12), (13)

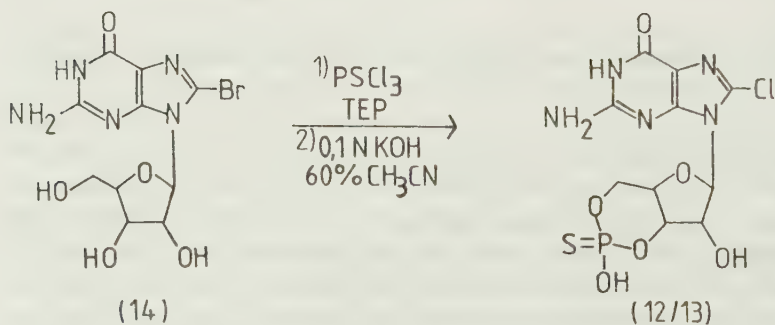


Abb. 18: Reaktionsschema zur Synthese von 8-Cl-cGMPS (12,13)

In Analogie zur Cyclothiophosphorylierung unter 3.1. wurde 8-Brom-guanosin (14) in Triethylphosphat gelöst und mit 2,2 Äquivalenten  $\text{PSCl}_3$  versetzt. Nach 6 Std. wurde die Reaktion beendet. Das HPLC-Chromatogramm wies jedoch kaum (Rp)-(12) und (Sp)-8-Cl-cGMPS (13) auf (2-4 %), dafür aber ein Nebenprodukt bei 3,60 Min, daß bereits bei der Thiophosphorylierung entstand und mit einem Anteil von 40 % die Ausbeute an den Diastereomeren stark zurückdrängt (Abb. 19).

Eine Strukturuntersuchung des abgetrennten Nebenproduktes brachte keine endgültige Klärung. Es handelt sich offenbar um eine Nucleobase, da im  $^1\text{H}$ -NMR die Signale für die Riboseprotonen fehlen. Darauf deutet auch das UV-Spektrum mit einem  $\lambda_{\text{max}} = 253$  und  $273$  nm hin. Die Base enthält weder Chlor noch Brom und ist nicht phosphoryliert. Guanin konnte durch Coinjektion ausgeschlossen werden.

Um die Ausbeute an 8-Cl-cGMPS (12),(13) zu steigern, wurde der Reaktionsansatz mit Pyridin versetzt. Das verkürzte zwar die Reaktionszeit, erhöhte aber nicht die Ausbeute. Auch eine Verlängerung der Reaktionszeit führte zu keinem befriedigenden Ergebnis. Erst durch Substitution des Lösungsmittels Triethylphosphat durch Trimethylphosphat konnte die Umsatzrate der Diastereomeren auf je etwa 10 % gesteigert werden (Abb. 19). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Synthese von 8-Cl-cAMPS nach dieser Methode gemacht. Auch hier konnte das Nebenprodukt noch nicht aufgeklärt werden <sup>55</sup>.

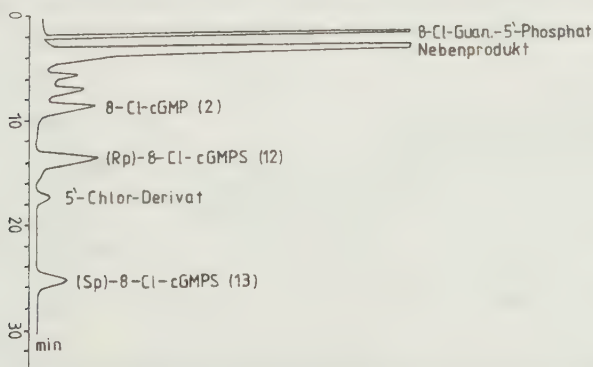


Abb. 19 : HPLC-Chromatogramm der Reaktionslösung nach der optimierten Cyclisierung

### 3.11. Versuche zur Darstellung von 8-Fluorguanosin-3',5'-cyclophosphat (1)

Alle verwendeten Chemikalien wurden vor der Umsetzung über Nacht an einer Hochvakuumanlage getrocknet und in einer Trockenbox unter Argon-Atmosphäre zusammengegeben. Das Lösungsmittel Acetonitril wurde 24 Std. über  $\text{CaH}_2$  gekocht und über die Hochvakuumanlage zu den Substanzen destilliert. Für die Umsetzungen wurde ein Glasrohr mit Teflengewinde und Anschlußstück zur Hochvakuumanlage benutzt.

#### 3.11.1 Syntheseversuche mit KF/18-Krone-6

Die Einführung von Fluor in einen heteroaromatischen Ring ist schwieriger als für die anderen Halogene. In aktivierten Ringen und gut solvatisierenden, aber wenig nucleophilen Lösungsmitteln (DMF, DMSO) gelingt ein Austausch von Chlorid gegen das nur schwach nucleophile Fluorid mit Kaliumfluorid <sup>70,71</sup>. Die Reaktivität des KF läßt sich durch die Verwendung von Kronenethern noch steigern, da das Metallkation komplexiert und die Löslichkeit in unpolaren, aprotischen Lösungsmitteln verbessert wird <sup>72</sup>.

Auf dieser Methode beruht die bisher einzige Synthesevorschrift zur Darstellung von geschütztem 8-Fluoradenosin aus geschütztem 8-Bromadenosin <sup>73</sup>.

In Anlehnung an diese Methode sollte 8-Fluorguanosin-2',3',5'-tri-O-acetylguanosin (26) hergestellt werden (Abb. 20).

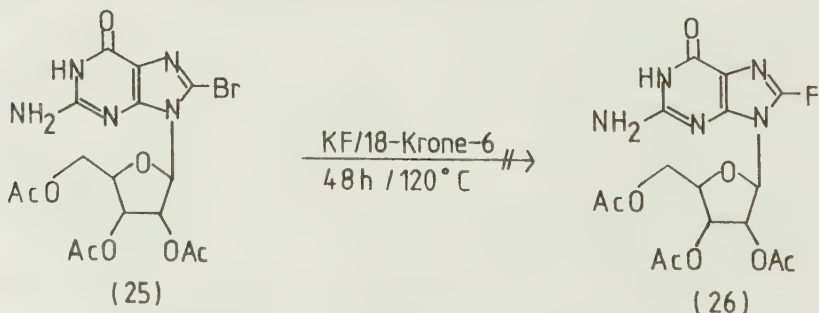


Abb.20: Reaktionsschema zur Synthese von geschütztem 8-Fluorguanosin (26) mit KF/18-Krone-6

Dazu wurden 1 mMol 8-Bromguanosin-2',3',5'-tri-O-acetylguanosin, 0,15 mMol 18-Krone-6 und 2 mMol KF in 15 ml Acetonitril gelöst und 48 Std. bei 120 °C in dem geschlossenen Glasrohr erhitzt. Der Druck betrug 4-5 atm.

Nach der Umsetzung konnten im HPLC-Chromatogramm 3 neue Signale beobachtet werden, die durch Flash-Chromatographie isoliert und spektroskopisch untersucht wurden. Die Auswertung der Spektren weist auf eine Acetylgruppenwanderung hin (Abb.21)

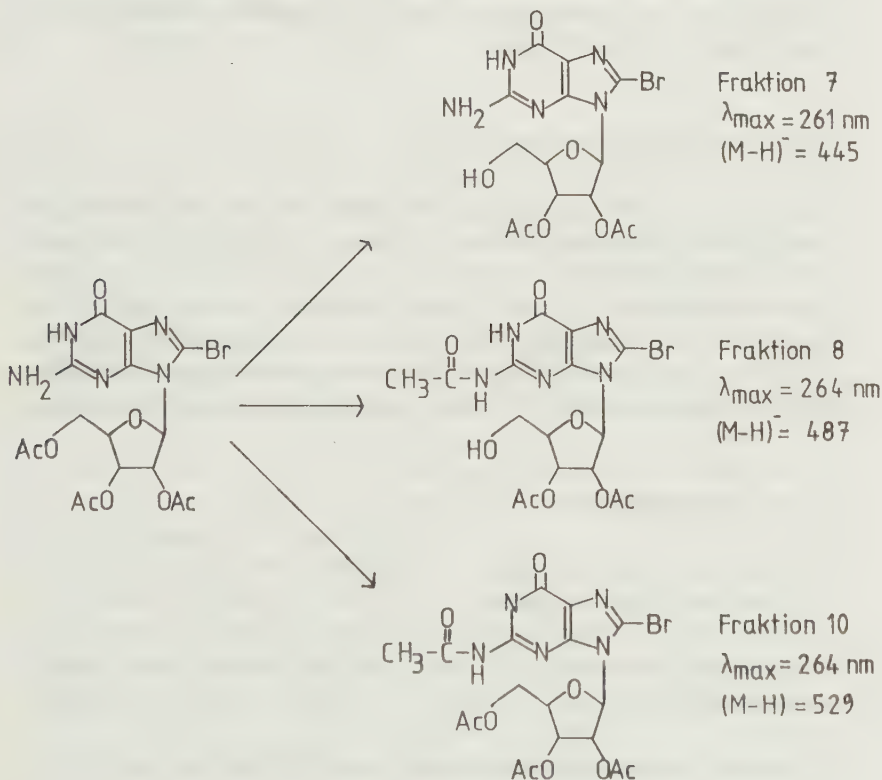


Abb.21: Strukturen der isolierten Verbindungen aus der Umsetzung von 8-Bromguanosin (14) mit KF/18-Krone-6

Die Abspaltung der Acetylgruppe an der 5'-Position läßt sich im  $^1\text{H}$ -NMR an einer Tieffeldverschiebung der 5'-Protonensignale von  $\delta = 4,4$  ppm zu  $\delta = 5,3$  ppm erkennen.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der vierfach acetylierten Verbindung fehlt das Signal für die  $-\text{NH}_2$ -Gruppe bei  $\delta = 6,6$  ppm. Stattdessen findet man ein neues Signal bei  $\delta = 11,9$  ppm, daß auf ein acides Proton hindeutet. Wir vermuten daher eine Bindung der vierten Acetylgruppe an die Amino - gruppe in Position 2.

Im  $^{19}\text{F}$ -NMR der Gesamtreaktionslösung ist nur ein Singulett für das  $\text{F}^-$ -Ion bei  $\delta = -122$  ppm zu sehen. Eine Substitution des Bromids durch Fluorid hat nicht stattgefunden.

### 3.11.2. Syntheseversuch mit $\text{KF}/\text{CaF}_2$

Ichikara et al. veröffentlichten 1986 eine Studie über die hohe Reaktivität einer  $\text{KF}/\text{CaF}_2$  Mischung (1:4) gegenüber den bisherigen Fluorierungs - mitteln  $\text{KF}$  und  $\text{KF}/18\text{-Krone}-6$  <sup>75)</sup>.

Um diese Möglichkeit zu testen, wurde 1 mMol 8-Bromguanosin (**14**) mit 2 mMol  $\text{KF}/\text{CaF}_2$  versetzt und in 10 ml Acetonitril gelöst. Die Reaktion wurde bei RT und bei  $120^\circ\text{C}$  im geschlossenen Glasrohr durchgeführt. Die Auswertung der HPLC - Chromatogramme zeigte keinerlei Umsetzung.

### 3.11.3. Syntheseveruche mit TASF

Tris(dimethylamino)sulfonium - trimethyldifluorsiliconat (TASF) (**27**) ist ein neueres Fluorierungsmittel <sup>76,77)</sup>, das in der org. Chemie z. B. zur Darstellung von Desoxyfluor - Zuckern eingesetzt wird, die über die bisherigen Synthesen mit Tetrabutylammoniumfluorid oder Diethyl - ammoniumsulfurtrifluorid (DAST -  $\text{Et}_2\text{N}^+\text{SF}_3^-$ ) nicht darstellbar waren <sup>78)</sup>.

Wir wollten dieses hochreaktive Reagenz daher zur Synthese von 8-Fluor - guanosin (**27**) anwenden (Abb. 22).

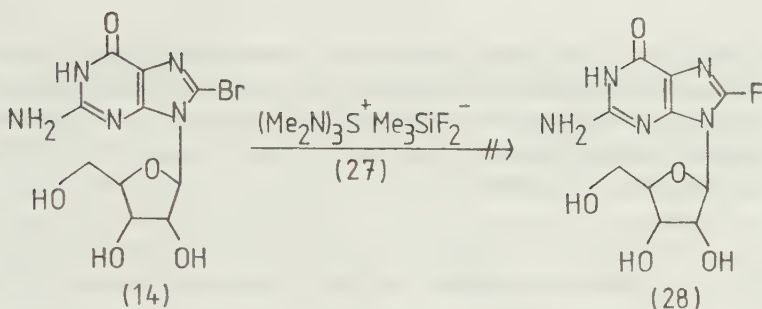


Abb.22: Reaktionsschema zur Synthese von 8-Fluorguanosin (28) mit TASF (27)

Zur Reaktion wurden äquimolare Mengen an 8-Bromguanosin (14) und TASF in Acetonitril gelöst und im Glasrohr mehrere Std. bei RT gerührt. Die anschließende HPLC-Kontrolle zeigte keinerlei Umsetzung. Auch eine Verdopplung TASF-Konzentration, eine Erhöhung der Temperatur auf 50 ° C oder eine Reaktionszeitverlängerung auf 4 Tage führten zu keinem Ergebnis. Ebenfalls negativ verlief der Versuch einer Umsetzung von TASF mit 8-Bromadenosin und 8-Cl-cGMP (2).

In einer letzten Umsetzung wurde 8-Bromguanosin (14) mit 2 Äquivalenten Fluorierungsmittel in  $\text{CH}_3\text{CN}$  gelöst und im geschlossenen Glasrohr 36 Std. bei 120 ° C gerührt. In der anschließenden Reaktionskontrolle durch HPLC tauchte ein neues Signal auf. Das Produkt wurde isoliert und konnte über spektroskopische Methoden als 8-Dimethylaminoguanosin (29) identifiziert werden (Abb 23).

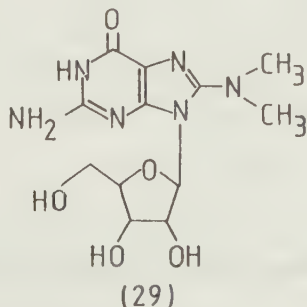


Abb.23 : Struktur von 8-Dimethylaminoguanosin (29)

Unter diesen drastischen Bedingungen kommt es offenbar zu einer Spaltung der glycosidischen Bindung und zur Substitution des Broms durch die Dimethylaminogruppe.

Eine Fluorierung wurde bei keiner der Reaktionen, weder an der Base noch an der Ribose, beobachtet.

### 3.11.5. Syntheserversuch nach der Balz - Schiemann Reaktion

Die Balz - Schiemann Reaktion wird zur Darstellung von Arylfluoriden eingesetzt. Es handelt sich dabei um die Reaktion von einem Amin mit Nitrosyltetrafluorboranat zum Diazoniumfluorborat und anschließender thermischer Zersetzung zum Fluorid <sup>79,80</sup>) (Abb. 24).

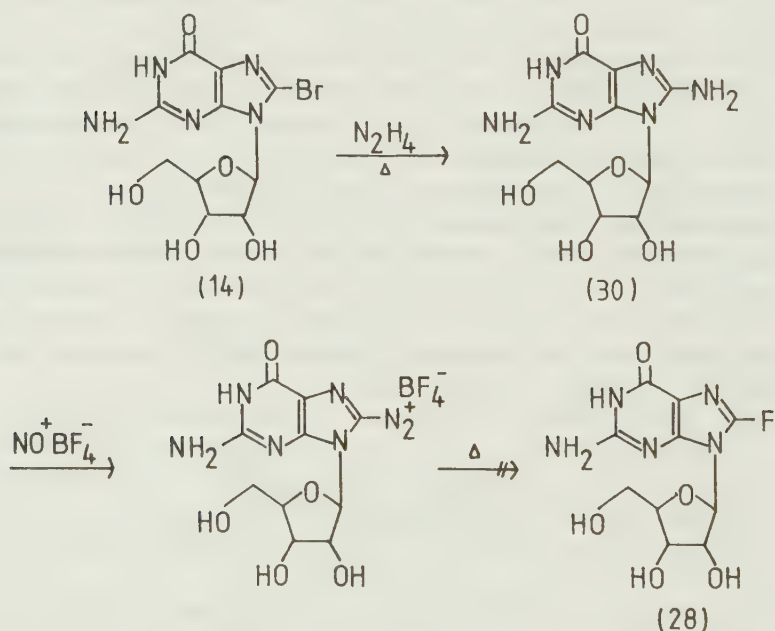


Abb.24: Reaktionsschema zur Balz - Schiemann Reaktion

8-Aminoguanosin (**30**) wurde mit 2 Äquivalenten  $\text{NO}^+\text{BF}_4^-$  versetzt und in Acetonitril gelöst. Nach 3 Std. wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in DMSO aufgenommen und 1 Std auf  $180^\circ\text{C}$  erhitzt. Im HPLC-Chromatogramm traten nach der Umsetzung zwei neue Signale auf. Der Reaktionsansatz wurde über Flash-Chromatographie getrennt und im  $^{19}\text{F}$ -NMR untersucht. Keine der isolierten Verbindungen enthielt Fluor und auch im UV war das typische Basen-Spektrum verschwunden. Wir nehmen an, daß sich das Derivat beim Erhitzen auf  $180^\circ\text{C}$  vollständig zersetzt hat.

### 3.12. Spektroskopische Methoden

#### 3.12.1. UV-Spektroskopie

In substituierten Heterocyclen, z. B. der Purinreihe, treten ausgeprägte Substituenteneffekte auf, so daß der routinemäßigen  $\lambda_{\max}$  Kontrolle in der Nucleotidchemie eine hohe Bedeutung zukommt. Je ausgeprägter die Konjugation des Purinringes mit den hinzugefügten Substituenten ist, um so mehr verschiebt sich die ursprüngliche Bande zu längeren Wellen <sup>81)</sup>.

Bei der homologen Reihe von cGMP, 8-Cl-cGMP (2), 8-Br-cGMP (3) und 8-I-cGMP (4) läßt sich die elektronenschiebende Wirkung der Substituenten an einer Rotverschiebung von 252 nm über 256 nm und 258 nm zu 262 nm beobachten.

Auch die Umsetzung von 8-Bromguanosin (14) zu 8-Mercaptoguanosin (15) ließ sich über UV-Spektroskopie gut verfolgen (siehe 3.4.1. und Abb. 25).

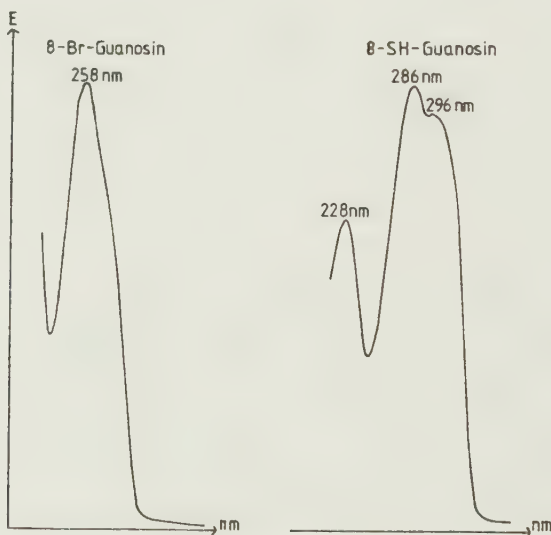


Abb. 25: UV-Spektren von 8-Bromguanosin (14) und 8-Mercaptoguanosin (18)

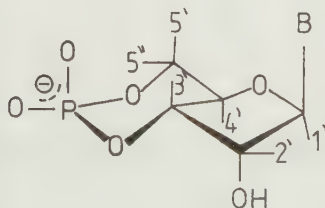
### 3.12.2. $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Eine wichtige Methode zur Charakterisierung von Cyclophosphaten ist die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie. Ein Vergleich der beiden Spektren für 8-Brom-guanosin (**14**) und 8-Br-cGMP (**3**) zeigt deutlich die Unterschiede auf, die sich durch den Ringschluß ergeben (Abb. 27).

Bei der Cyclisierung wird die Konformation des Riboseringes durch den auftretenden Ringspannungseffekt soweit geändert, daß sich der transvicinale Diederwinkel zwischen H-1' und H-2' verkleinert. Wie man aus der Karplus-Conroy-Kurve ableiten kann, vermindert bzw. entfällt dadurch die Kopplungskonstante  $J_{-1',2'}$ <sup>82)</sup> und das Signal für das H-1'-Proton vereinfacht sich zum Singulett<sup>83)</sup>.

Das H-3'-Proton wird durch eine zusätzliche Kopplung mit dem Phosphor von einem dd-Signal zu einem ddd-Signal aufgespalten. Außerdem ist eine Tieffeldverschiebung zu beobachten.

Die 5'- und 5''-Protonen sind diastereotop. Die magnetische Nicht-äquivalenz führt zu einer Aufspaltung in zwei Signale. Die Kopplungskonstante von 20 Hz für die H-5', P Spin-Spin-Kopplung deutet auf eine trans-vicinale Anordnung hin, während J-5', P und J-3', P mit 2,0 Hz auf eine gauche-Vicinale Kopplung schließen lassen<sup>84)</sup>. Diese Diederwinkel können nur in der Sesselkonformation des Cyclophosphatringes auftreten<sup>85)</sup>. Auch hier ist eine Tieffeldverschiebung der 5'- und 5''-Signale durch den Phosphatrest zu sehen.



**Abb.26 : Struktur des Phosphatringes**

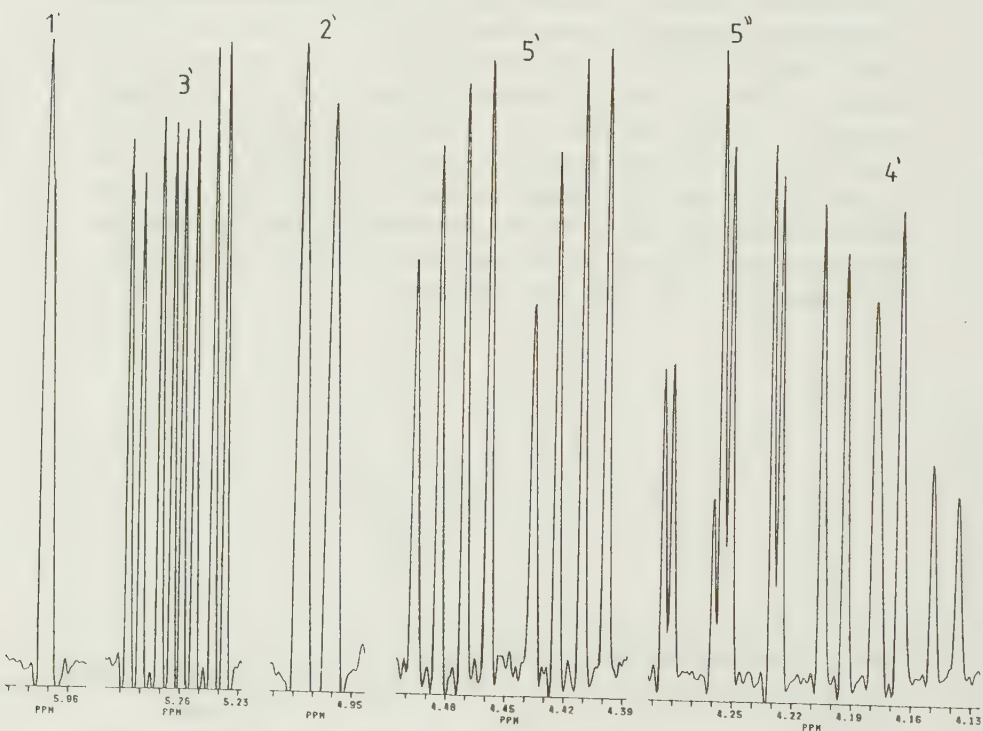
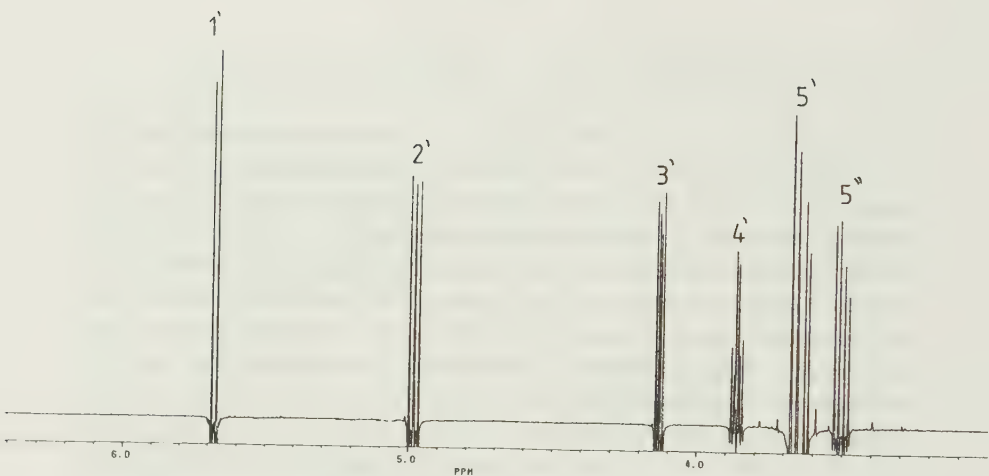


Abb. 27:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von 8-Bromguanosin (14) (oben) und 8-Brom-cGMP (3) (unten)

### 3.12.3. $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie

Die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie eignet sich gut zur Strukturaufklärung und Identifizierung von Nebenprodukten sowie zur Konfigurationsbestimmung von Cyclothiophosphaten.

Nachdem die absolute Konfiguration der Diastereomeren von cAMPS durch  $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$ -Spektroskopie bestimmt worden war <sup>48)</sup>, zeigte sich, daß die Resonanzsignale der (Rp)- und (Sp)- Enantiomeren zwischen 52 und 58 ppm liegen, wobei dem (Rp)-Derivat das zu tieferem Feld verschobene Signal zuzuordnen ist (Abb. 28)

Im Gegensatz dazu zeigen die Cyclophosphate eine Hochfeldverschiebung bei -3 ppm.

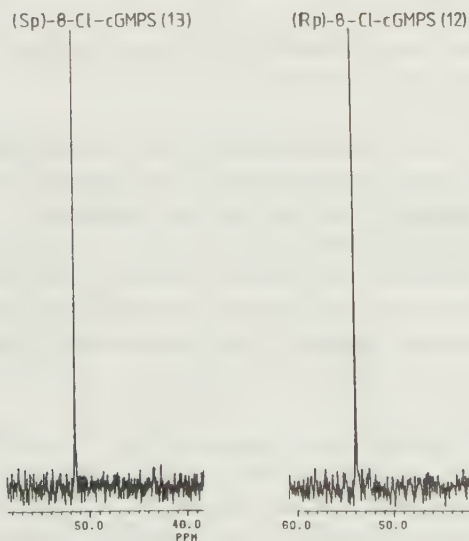


Abb. 28:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signale für (Rp)- (12) und (Sp)-8-Cl-cGMPS (13)

### 3.12.4. FAB-MS-Spektrometrie

Die Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie ist eine neuere Methode zur Ionisierung hochmolekularer und thermisch labiler Verbindungen und daher zur Identifizierung von Nucleotiden besonders gut geeignet.

Dazu werden die zu untersuchenden Substanzen in einer Glycerinmatrix gelöst und mit Edelgasatomen (Ar, Xe) von 3-7 kV beschossen <sup>86)</sup>. Es kommt zu energiearmen Fragmentierungsreaktionen, die zusätzlich zum Molekülion, die Strukturaufklärung erleichtern <sup>87)</sup>.

Da es sich bei den Cyclophosphaten um acide Verbindungen handelt, werden bevorzugt  $(M-H)^-$  Ionen durch Abspaltung eines Protons gebildet (negative mode). Die Bildung von positiv geladenen Molekülionen erfolgt im positive mode durch Anlagerung eines Protons. Ihre Intensität ist allerdings deutlich geringer. Durch Anlagerung von Fremdionen (Kalium, Natrium) sowie der Glycerinmatrix bilden sich signifikante Molekülionen der Art  $(M+X+Gly)^+$  die die Identifizierung von einzelnen Substanzen erleichtern können.

Zu den bekanntesten FAB-induzierten Reaktionen an Nucleotiden gehört der Bruch der glycosidischen Bindung. Diese Fragmentierung wurde in allen Spektren der synthetisierten Derivate nachgewiesen.

Eine zweite FAB-induzierte Reaktion ist die Dehalogenierung an in unterschiedlichen Positionen substituierten Halogen-Cyclonucleotiden <sup>88,89)</sup>. Bei der Auswertung der Spektren aller vier halogensubstituierten Verbindungen konnte dieser Halogen-Wasserstoffaustausch beobachtet werden. Dabei nimmt der Austausch mit steigender C-X - Bindungsstärke ab.

In Abb. 29 ist das Fragmentierungsmuster für 8-I-cGMP (4) im negative mode abgebildet. Deutlich sind die Abspaltung des Jodids  $(M-H-I)^-$  und die Spaltung der glycosidischen Bindung  $(B-H)^-$  sowie die Anlagerung von Glycerin an das Molekülion  $(M-H+Gly)^-$  zu erkennen.

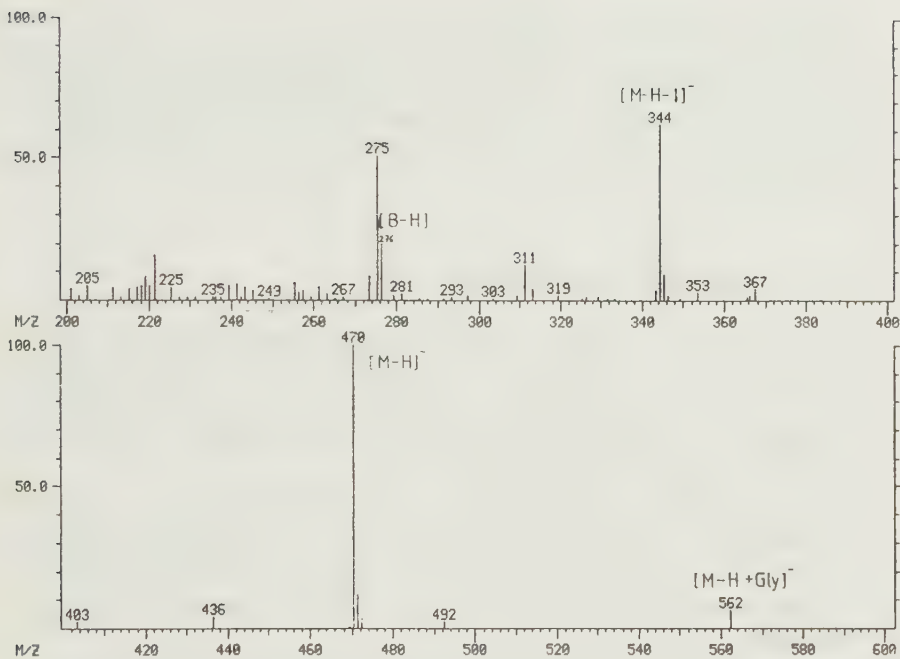


Abb.29 : FAB-MS-Spektrum von 8-I-cGMP (4) im negative mode

### 3.13. Aufklärung von Nebenprodukten

Bei der Synthese der Cyclophosphate und Cyclothiophosphate entstehen, bedingt durch den Mechanismus der Reaktion, mehrere Nebenprodukte, die nur teilweise isoliert und charakterisiert wurden, aber für alle Umsetzungen charakteristisch sind.

#### 3.13.1. Nucleosid-5'-phosphate IV

1967 wurde von M. Yoshikawa et al. eine Synthesevorschrift zur Darstellung von 5'-Phosphaten aus ungeschützten Nucleosiden veröffentlicht <sup>90,91</sup>). Dabei handelt es sich um die Umsetzung von Nucleosiden mit  $\text{POCl}_3$  in Trialkylphosphaten zum Dichlorphosphat II und anschließender Hydrolyse in Eiswasser.

Im Gegensatz dazu wird bei unserer Cyclisierungsvorschrift der 2. Reaktionsschritt in Acetonitril durchgeführt, um die intramolekulare Kondensation zum Cyclophosphat zu favorisieren (siehe 3.1.). Dabei kann die Bildung von Nucleosid-5'-phosphaten IV nicht vollständig ausgeschlossen werden.

So ließ sich nach der Trennung der Reaktionsansätze durch Flash-Chromatographie mit einer der ersten Verbindungen immer das entsprechende Nucleosid-5'-Phosphat IV isolieren (siehe 8.2.-8.11. und Abb. 30).

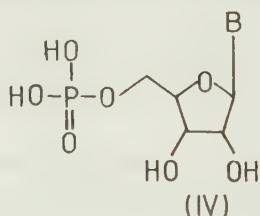


Abb.30 : Struktur von Nucleosid-5'-phosphaten IV

Daß es sich dabei um das 5'-Phosphat und nicht um die 2'- oder 3'-Verbindung mit der gleichen Masse handelt, konnte durch ein gekoppeltes

$^{31}\text{P}$ -NMR bewiesen werden, in der das Singulett bei 1 ppm durch Spin-Spin-Kopplung mit der  $-\text{CH}_2-$ -Gruppe in Position 5 zum Triplet aufgespalten wird (Abb. 31), während beim 2'- oder 3'-Phosphat nur ein Dublett zu erwarten gewesen wäre.

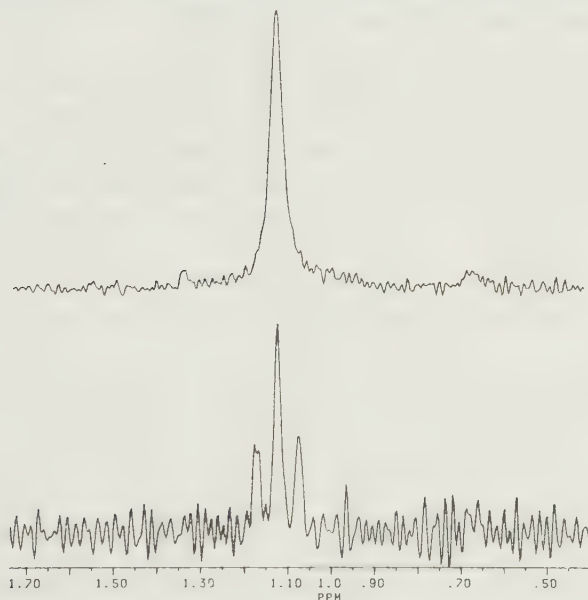


Abb. 31: Entkoppeltes (oben) und gekoppeltes (unten)  $^{31}\text{P}$ -NMR - Spektrum für 2-Aminopurinribosid-5'-Phosphat

### 3.13.2. Nucleosid-diphosphate

Bei der Synthese von 8-I-cGMP (4) und 2- $\text{CF}_3$ -cBiMP (9) mit sehr langen Phosphorylierungszeiten konnten, zusätzlich zu den Nucleosid-5'-phosphaten, auch 5',2'(3')-Diphosphate isoliert werden.

Im gekoppelten  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum der isolierten Fraktionen sieht man das Triplett bei 0,77 ppm für das 5'-Phosphat und das Dublett bei 0,2 ppm für die Spin-Spin-Kopplung zwischen  $^{31}\text{P}$  und H-2' und H-3' (Abb. 32). Es scheinen sich sowohl 2',5'- als auch 3',5'-Diphosphate zu bilden, da im  $^1\text{H}$ -NMR die Signale für H-2' und H-3' tieffeldverschoben sind. Eine genauere Auswertung über die Kopplungskonstanten war aufgrund der schlechten Auflösung nicht möglich.

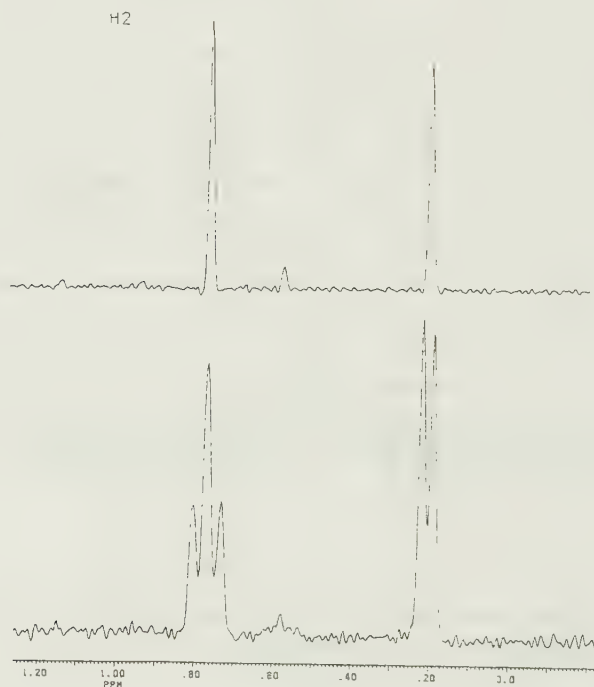


Abb. 32: Entkoppeltes (oben) und gekoppeltes (unten)  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazolribosid - 2'(3'),5'-diphosphat

Beim Vorliegen von 2',5'-Diphosphatdichloridat im Phosphorylierungsansatz sollte beim Cyclisieren auch Nucleosid-3',5'-Cyclophosphat-2'-phosphat entstehen. Tatsächlich konnte diese Verbindung bei der Synthese von 8-J-cGMP (**4**) in Fraktion 4 zusätzlich zum Monophosphat und den Diphosphaten im FAB-MS nachgewiesen werden (Abb. 33). Im Spektrum sieht man deutlich den FAB-induzierten Jod-Wasserstoffaustausch (siehe 3.12.3.).

Daß bei der Reaktion auch 2',3'-Cyclophosphat-5'-phosphat gebildet wird, konnte durch das  $^{31}\text{P}$ -NMR - Spektrum der Fraktion 4 gezeigt werden. Dort war sowohl das Singulett bei -2,55 ppm für das 3',5'-Sechsringsphosphat als auch der vom 2',3'-Cyclophosphat gebildete Fünfring mit einer chemischen Verschiebung von 18 ppm zu beobachten; allerdings in untergeordneter Menge.

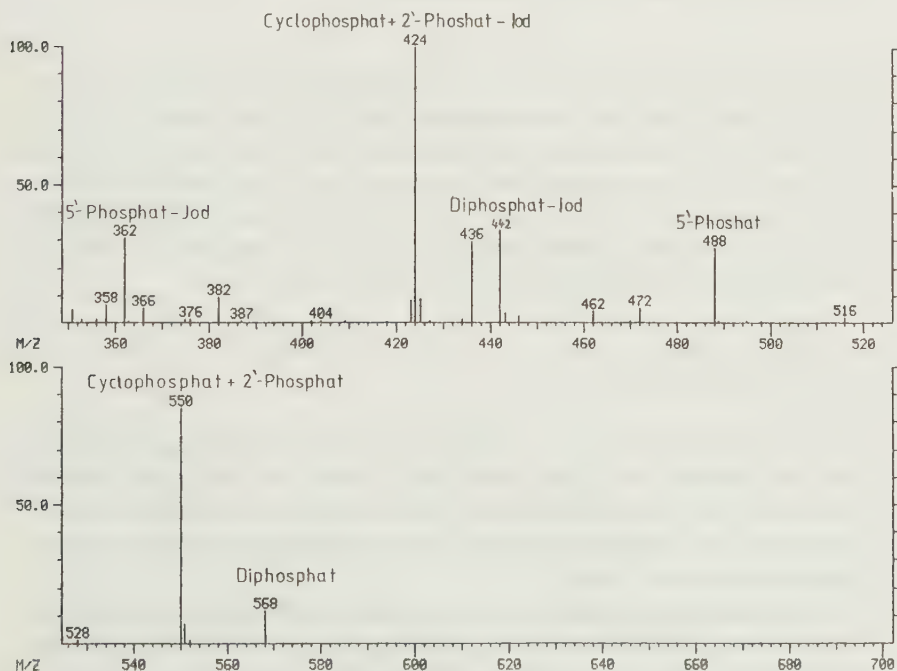


Abb.33: FAB-MS-Spektrum der Fraktion 4 nach der Trennung des 8-I-cGMP (**4**) - Reaktionsansatzes

### 3.13.3. 5'-Chlornucleoside V

Bei der Darstellung von 6-SH-cGMP (5), cIMP (6) und 8-Cl-cGMPS (12,13) (Abb. 19) konnte ein sehr lipophiles Produkt isoliert werden, das als 5'-Chlornucleosid V (Abb. 34) identifiziert wurde.

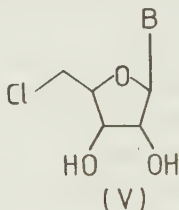


Abb.34: Struktur von 5'-Chlornucleosiden V

5'-Chlornucleoside V erhält man üblicherweise durch Einwirken von Thionylchlorid auf das entsprechende Ribosid <sup>92)</sup>. M. Morr et al. beobachteten jedoch auch bei der Reaktion von Nucleosiden mit POCl<sub>3</sub> in einer TEP- Suspension die Umsetzung zum 5'-Chlorderivat, während eine klare Lösung das erwartete 5'-Phosphat lieferte <sup>93)</sup>. Die Bildung dieses Nebenproduktes wird durch lange Reaktionszeiten und konzentrierte Reaktionslösungen noch erhöht.

### 3.13.4. Nucleobasen

Auffallend bei der Synthese der Halogen-Cyclonucleotide war ein bereits bei der Phosphorylierung gebildetes Nebenprodukt mit sehr kurzer Retentionszeit. Nach der Auftrennung des Reaktionsgemisches konnte im FAB-MS-Spektrum der entsprechenden Fraktionen das Molekülion für die reine Base nachgewiesen werden.

Wir nehmen an, daß Spuren von Feuchtigkeit POCl<sub>3</sub> hydrolisieren und es zu einer säurekatalysierten Spaltung der glycosidischen Bindung kommt <sup>94)</sup>. Dabei erzeugen die Halogene am Imidazolring einen in-

duktiven Effekt, der den ersten Schritt der Solvolyse, die Protonierung an N-7, erleichtert <sup>95)</sup>.

Dagegen scheinen Substituenten am Pyrimidin keinen großen Einfluß auf die Reaktion zu haben, da bei der Umsetzung der anderen Derivate das Auftreten von Nucleobasen in nachweisbarer Menge nicht beobachtet wurde.

## 4. DER LOG $k'_w$ - WERT

### 4.1. Theoretische Grundlagen

Die Gesamtlipophilie eines Moleküls ist im wesentlichen für den Transport und die Verteilung von Wirkstoffen in biologischen Systemen bestimmend.

Eine quantitative Bestimmung der Lipophilie geht auf C. Hansch zurück <sup>96)</sup>.

Danach ist die Lipophilie, ausgedrückt durch den n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient  $P$ , ein additiv-kostituiver Molekülparameter.  $\pi$  ist der Lipophiliebetrag des Substituenten X, bezogen auf den Austausch von H gegen X <sup>97)</sup>.

$$\log P_{R-X} - \log P_{R-H} = \pi$$

Da heute umfangreiche  $\pi$ -Tabellen vorliegen, läßt sich die relative Lipophilie (bezogen auf die jeweilige unsubstituierte Stammverbindung) berechnen. Allerdings sind die Anwendungsbeispiele begrenzt.

Eine weiterführende und exaktere Methode zur Bestimmung der Lipophilie ermöglicht die Reverse-Phase HPLC.

Es zeigte sich, daß der Kapazitätsfaktor  $k'$ , gemessen an durch n-Alkyl-modifizierte Kieselgele in binären mobilen Phasen mit dem n-Octanol / Wasser Verteilungskoeffizient korreliert.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Zur Linearisierung wird üblicherweise die logarithmierte Form  $\log k'$  verwendet.

Um die Korrelation zwischen dem Verteilungskoeffizienten  $P$  und dem  $\log k'$  - Werten herzustellen, werden in Wasser / Methanol gemessene  $\log k'$  - Werte gegen 0 % Methanol extrapoliert. Man erhält :

$$\log k'_w = \log k' - S \phi$$

wobei S die Steigung der Regressionsgeraden und  $\phi$  die Methanolkonzentration in einem Methanol / Wasser Laufmittelsystem wiedergibt.

#### 4.2. Diskussion der Ergebnisse

Um Ladungsinteraktionen zwischen der mobilen Phase und der zu messenden Substanz auszugleichen, wurde dem Laufmittel 100 mM Phosphatpuffer ( pH 7.5 ) zugesetzt. Gemessen wurde bei Methanolkonzentrationen zwischen 10 % und 51 % - oberhalb 51 % fällt der Phosphatpuffer aus und unterhalb 10 % ist das Modell nicht mehr linear <sup>98)</sup>. Die optimalen Retentionsbedingungen liegen bei einem  $\log k'$  - Wert zwischen - 0,5 und + 1,3.

Tabelle 1 : Regressionsanalyse zur Bestimmung des  $\log k'w$  - Wertes

| Verbindung                   | Quadratischer<br>$\log k'w$ |        |
|------------------------------|-----------------------------|--------|
| 2-CF <sub>3</sub> -cBiMP (9) | 2,59                        | (0,03) |
| (Sp)-8-Cl-cGMPS (13)         | 1,74                        | (0,02) |
| 8-I-cGMP (4)                 | 1,44                        | (0,05) |
| (Rp)-8Cl-cGMPS (12)          | 1,31                        | (0,02) |
| 8-Br-cGMP (3)                | 1,25                        | (0,05) |
| cPuMP (8)                    | 1,16                        | (0,05) |
| 8-Cl-cGMP (2)                | 1,15                        | (0,03) |
| 2-NH <sub>2</sub> -cPuMP (7) | 1,14                        | (0,05) |
| (Sp)-cGMPS (11)              | 1,04                        | (0,05) |
| 6-SH-cGMP (5)                | 0,84                        | (0,07) |
| (Rp)-cGMPS (10)              | 0,80                        | (0,08) |
| cIMP (6)                     | 0,31                        | (0,02) |
| cGMP                         | 0,29                        | (0,02) |

In Tabelle 1 sind die  $\log k'_w$  - Werte der einzelnen Verbindungen nach abnehmender Lipophilie aufgeführt.

Mit zunehmender Größe des unpolaren Substituenten in Position 8 an der Base steigt die Lipophilie.



Eine Reduzierung der Wasserstoffbrückenbindungsmöglichkeiten an der Base Guanosin führt ebenfalls zu einer Steigerung des  $\log k'_w$  - Wertes, wobei die 2-Aminogruppe einen höheren Lipophiliebeitrag leistet als die 6-Oxogruppe.



Tabelle 2: Isokratische  $\log k'$ - Werte bei verschiedenen Methanolkonzentrationen (  $\varphi_M$  ) in 100 mM Phosphatpuffer ( pH 7.5 ).

| Verbindung                   | Volumenanteil Methanol ( $\varphi_M$ ) |       |       |       |      |      |
|------------------------------|----------------------------------------|-------|-------|-------|------|------|
|                              | 0,48                                   | 0,45  | 0,42  | 0,39  | 0,36 | 0,33 |
| 2-CF <sub>3</sub> -cBiMP (9) | 0,114                                  | 0,299 | 0,400 | 0,545 |      |      |
| (Rp)-8-Cl-cGMPS (12)         |                                        |       |       |       |      |      |
| (Sp)-8-Cl-cGMPS (13)         |                                        |       |       |       |      |      |
| 8-Cl-cGMP (2)                |                                        |       |       |       |      |      |
| 8-Br-cGMP (3)                |                                        |       |       |       |      |      |
| 8-I-cGMP (4)                 |                                        |       |       |       |      |      |
| cPuMP (8)                    |                                        |       |       |       |      |      |
| (Sp)-cGMPS (11)              |                                        |       |       |       |      |      |
| cGMP                         |                                        |       |       |       |      |      |
| cIMP (6)                     |                                        |       |       |       |      |      |
| 2-NH <sub>2</sub> -cPuMP (7) |                                        |       |       |       |      |      |
| (Rp)-cGMPS (10)              |                                        |       |       |       |      |      |
| 6-SH-cGMP (5)                |                                        |       |       |       |      |      |



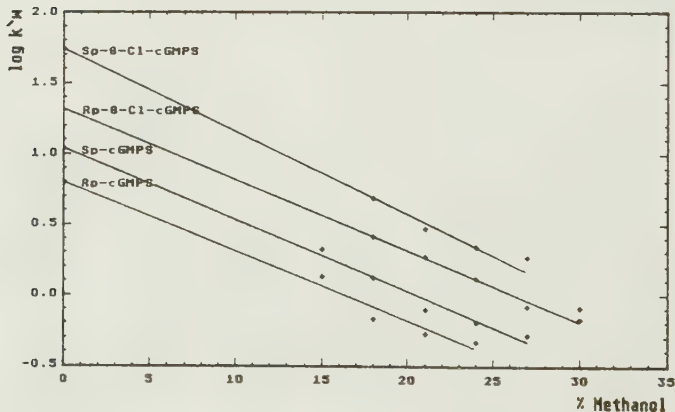
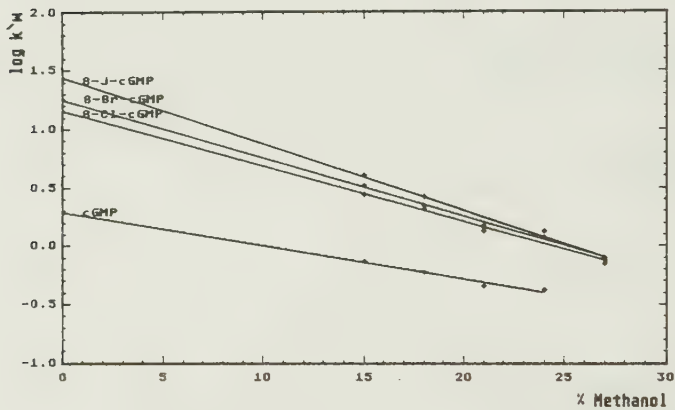
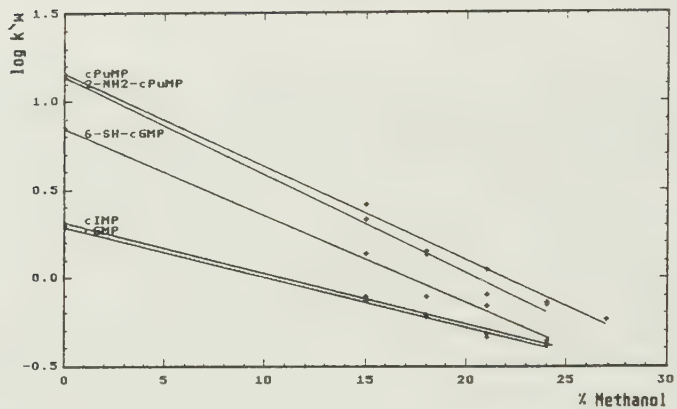


Abb.34: Graphische Darstellung der  $\log k'_w$  - Werte

## 5.        **UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBSTRATSPEZIFITÄT DER CALMODULIN-ABHÄNGIGEN PHOSPHODIESTERASE**

### 5.1.       **Einführung**

Cyclonucleotidphosphodiesterasen spielen eine wichtige Rolle in der Regelung von Zellfunktionen (siehe 2.1.). In Säugetiergewebe kann man zwischen einer Vielzahl von Phosphodiesterasen wie z.B. der cAMP-abhängigen cPDE oder einem cGMP-aktiviertem Enzym unterscheiden <sup>15)</sup>. Zusätzlich gibt es hochspezialisierte Formen wie die Licht-aktivierte cPDE in der Retina <sup>12,13)</sup>.

In dieser Arbeit haben wir die Hydrolyse der synthetisierten Cyclo-nucleotide durch die Calmodulin-abhängige cPDE aus Rinderherz gemessen, um eine erste Aussage über die Metabolisierung der Substanzen in der Zelle machen zu können. Außerdem sind die Verbindungen aus dem Test-Kit gut geeignet, die molekularen Wechselwirkungen zwischen Substrat und Bindungsstelle im Enzym zu untersuchen.

### 5.2.       **Diskussion der Ergebnisse**

In Tabelle 3 sind die Abbauraten der einzelnen Verbindungen aufgelistet und durch Werte anderer Arbeitsgruppen ergänzt. Zusätzlich wurde 8-Benzylthio-cGMP (31) <sup>41)</sup> in die Untersuchung mit aufgenommen.

Aus der Arbeit von van Haastert et al. <sup>101)</sup> ist bekannt, daß es keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Nucleobase und der Bindungsstelle in der Cyclophosphodiesterase gibt. Anscheinend wird das Substrat nur über eine Bindung zum exocyclischen Sauerstoff am Phosphatring sowie einer Dipol - Dipol Wechselwirkung zwischen der Base und einer aromatischen Aminosäure in der Polypeptidkette gebunden.

Tabelle 3 : Hydrolyse von Cyclonucleotid - Analoga durch die Calmodulin - abhängige Phosphodiesterase

V' ist die maximale Abbaugeschwindigkeit des Analogens relativ zu cGMP:  $V' = V(\text{Analog}) / V(\text{cGMP})$

| Verbindung                   | V'      |                              |                        |
|------------------------------|---------|------------------------------|------------------------|
|                              | Butt    | van Haastert <sup>101)</sup> | Coenen <sup>102)</sup> |
| <b>cGMP</b>                  | 1,0     | 1,0                          |                        |
| cIMP (6)                     | 0,37    | 1,85                         |                        |
| cPuMP (8)                    | 0,31    | 2,5                          |                        |
| 2-NH <sub>2</sub> -cPuMP (7) | 0,25    |                              |                        |
| 6-SH-cGMP (5)                | 0,19    |                              |                        |
| cBiMP (32)                   |         | 1,6                          |                        |
| 2-CF <sub>3</sub> -cBiMP (9) | 0,08    |                              |                        |
| (Sp)-cGMPS (11)              | 0,006   |                              |                        |
| 8-Cl-cGMP (2)                | 0,00013 |                              |                        |
| 8-Br-cGMP (3)                | 0,0001  |                              |                        |
| 8-I-cGMP (4)                 | 0,00005 |                              |                        |
| 8-BzS-cGMP (31)              | 0       |                              |                        |
| (Sp)-8-Cl-cGMPS (13)         | 0       |                              |                        |
| (Rp)-cGMPS (10)              | 0       |                              |                        |
| (Rp)-8-Cl-cGMPS (12)         | 0       |                              |                        |
| <b>cAMP</b>                  |         | 1,42                         | 1,3                    |
| 8-Br-cAMP                    |         | 0,28                         |                        |
| 8-Cl-cAMP                    |         |                              | 0,3                    |
| (Sp)-cAMPS                   |         | 0,02                         |                        |
| (Rp)-cAMPS                   |         | 0                            |                        |

Diese Aussagen konnten wir mit unseren Untersuchungen bestätigen. Eine Reduzierung der Wasserstoffbrückenbindungsmöglichkeiten an der Base bis hin zum Purin-Grundgerüst führte zu keiner signifikanten Änderung in der Abbaurate des Enzyms (siehe Tabelle 3)

Die Hydrolysestabilität des (Rp)-Diastereomeren mit einer equatorialen Stellung des exocyclischen Schwefelatoms am Phosphatring wurde bei den Guanosin-Derivaten (Rp)-cGMPS (10) und (Rp)-8-Cl-cGMPS (12) ebenfalls beobachtet. Die Stabilität der Rp-Isomeren ist für alle bis jetzt getesteten Cyclophosphodiesterasen gefunden worden <sup>101,103,104</sup>) und wird auf die für die Hydrolyse höhere Energiebarriere beim Übergang vom Tetraeder zur trigonalen Bipyramide durch den nucleophilen Angriff auf den Phosphor zurückgeführt <sup>101,105</sup>). Für die Sp-Diastereomeren ist diese Energiebarriere zwar niedriger, liegt aber noch über der für die Cyclophosphate, so daß der Abbau entsprechend langsamer ist. Zusätzlich wird der Angriff durch die höhere Elektrophilie am Phosphor aufgrund der  $p\pi-d\pi$  Rückbindung erschwert.

Vergleicht man die in 8-Position derivatisierten Guanosincyclophosphate miteinander, so nimmt die Hydrolyse mit steigendem Radius des Substituenten ab. 8-Benzylthio-cGMP wird gar nicht mehr abgebaut. Dieses Verhalten wird auch bei 8-substituierten cAMP-Derivaten beobachtet und mit der Einschränkung der freien Drehbarkeit um die glycosidische Bindung erklärt <sup>103</sup>).

Erstaunlich ist jedoch die große Hydrolysestabilität der 8-substituierten cGMP-Derivate im Gegensatz zu den entsprechenden cAMP-Verbindungen. So werden 8-Cl-cGMP (2) und 8-Br-cGMP (3) etwa 10.000 mal schlechter abgebaut als 8-Cl-cAMP und 8-Br-cAMP.

Interessant ist auch, daß 2-CF<sub>3</sub>-cBiMP (9), dessen Trifluormethylgruppe vom Radius her mit Iod vergleichbar ist, ebenfalls ein relativ gutes Substrat für die cPDE darstellt, während 8-I-cGMP (4) kaum noch hydrolysiert wird.

Um eine Erklärung für dieses so unterschiedliche Verhalten zu finden, wurden die physiko-chemischen Daten der 8-substituierten cAMP- und cGMP-Derivate miteinander verglichen.

Alle Verbindungen liegen in der syn-Konformation vor und sind in ihrer Drehbarkeit um die glycosidische Bindung eingeschränkt <sup>106)</sup>. Die Stärke und Richtung der Dipolmomente (siehe Abb. 8) sowie die  $\log k_w$ -Werte (siehe Tabelle 2) zeigen keinerlei Korrelation mit den Hydrolysedaten. Auch die HOMO und LUMO-Werte, die ein Maß für die  $\pi$ -Elektronen Donor- und Akzeptoreigenschaften einer Verbindung sind und über die Stärke der Charge-Transfer-Wechselwirkungen zwischen Nucleobase und aromatischen Gruppen in der Bindungstasche entscheiden, sind in ihren Differenzen zu gering, um diesen drastischen Unterschied in den Abbauraten zwischen 8-derivatisierten cAMP- und cGMP-Substanzen zu erklären.

Ein Versuch, ähnliche Diskrepanzen bei den anderen Cyclophosphodiesterasen herauszuarbeiten <sup>101,104,107,108)</sup>, scheiterte daran, daß bis jetzt keine vergleichenden 8-substituierten cAMP- und cGMP-Derivate getestet worden sind und sich außerdem die Bindungsstellen der Enzyme voneinander unterscheiden.

Bis jetzt ist es uns nicht gelungen, eine Korrelation zwischen der Hydrolyse und definierten chemischen und/oder physiko-chemischen Daten der Substanzen für die Calmodulin-abhängige Phosphodiesterase herzustellen. Eine mögliche Erklärung könnte in den unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von cAMP und cGMP liegen. So wird cGMP zwar besser gebunden - cAMP aber schneller hydrolysiert.

Für genauere Studien müssen die Kinetiken der einzelnen Schritte (Erkennen, Binden und Abbau) sowohl für die Stimulation als auch für die Hydrolyse dieses komplexen Prozesses näher untersucht werden. Erst dann wird es möglich sein, genauere Aussagen über die molekularen Wechselwirkungen zwischen Substrat und Rezeptor zu machen und die Unterschiede zwischen cAMP- und cGMP-Derivaten zu verstehen.

## 6. STUDIEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNGS- STELLEN IN DER cGMP-ABHÄNGIGEN PROTEIN KINASE

### 6.1. Einführung

Es gibt Reaktionen, bei denen sich die Botenstoffe cAMP und cGMP gegenseitig regulieren (Yin-Yang- Dualismus). So wird die cAMP - abhängige Phosphorylierung eines mit Tubulin assoziierten Proteins durch cGMP unterdrückt, wobei es sich jedoch nicht um eine kompetitive Hemmung handelt, sondern offensichtlich eine Phosphodiesterase stimuliert wird <sup>109)</sup>.

Das Vorkommen beider „second messenger“ in einer Zelle führt zwangsläufig zu der Überlegung, daß die Bindungen an die jeweilige Proteinkinase unterschiedlich sein müssen, um nicht durch cGMP die cA - Kinase zu aktivieren - und umgekehrt.

An den cAMP-abhängigen-Proteinkinasen wurden die molekularen Wechselwirkungen weitestgehend aufgeklärt <sup>30,35)</sup>. Mitentscheidend für die Bindung und Aktivierung dieser Enzyme sind  $\pi$ -Elektronen-Donor- und Akzeptor-Wechselwirkungen zwischen dem Adeninring und aromatischen Aminosäuren in der Polypeptidkette (Stacking). Wasserstoffbrückenbindungen zu Donor- bzw. Akzeptorgruppen in der Nucleobase wurden nicht beobachtet.

Da sich die essentiellen Bindungen zwischen den Proteinkinasen und cAMP bzw. cGMP in der Phosphatregion und an der Ribose nicht unterscheiden, muß eine Erklärung für die differenzierte Aktivierung in den unterschiedlichen molekularen Wechselwirkungen zwischen den Basen und den Aminosäuren in der Bindungstasche liegen. Diese möglichen Wechselwirkungen zwischen dem Guaninring und der cG-Kinase sind hier untersucht und die Ergebnisse mit dem Bindungsmodell für die cAMP- abhängige Proteinkinase verglichen und diskutiert worden.

## 6.2. Diskussion der Ergebnisse

Der Protein-Kinase-Assay wurde nach der Methode von R. Roskoski durchgeführt <sup>110)</sup>. Gemessen wird dabei die Menge an radioaktivem Phosphat ( $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP), die nach der Stimulierung der Protein-Kinase durch das Substrat auf ein Akzeptor-Protein übertragen wird.

In Tabelle 4 sind die absoluten und relativen Werte für die halbmaximale Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch die synthetisierten Derivate zusammengefaßt. Zusätzlich wurden von uns noch cBiMP (32), 8-NH<sub>2</sub>-cGMP (36) und 8-BzS-cGMP (31) <sup>41)</sup> in die Untersuchung einbezogen. Die Liste ist durch einige Daten aus der Arbeit von Corbin et al. <sup>36)</sup> ergänzt worden.

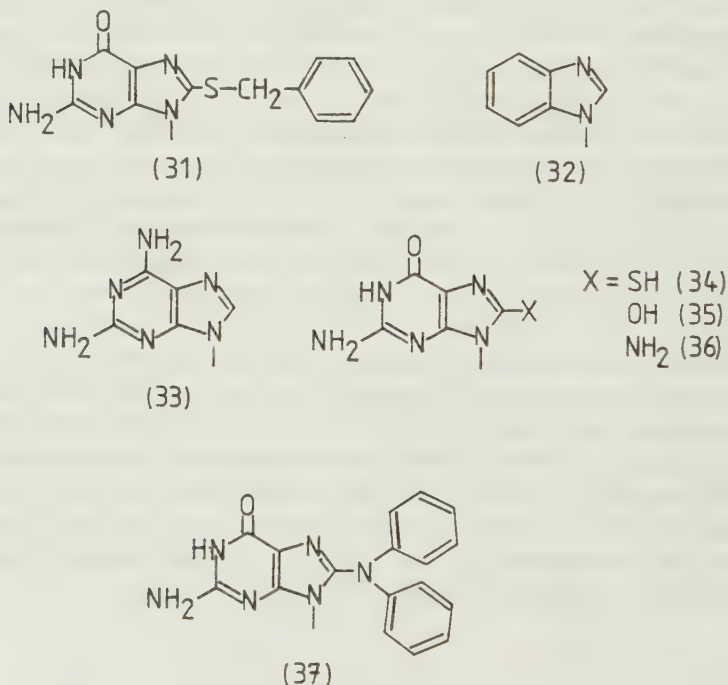


Abb.35: Strukturen ausgewählter Nucleobasen der entsprechenden Cyclophosphate

Tabelle 4: Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch Cyclonucleotidanaloga

$K_a$  = Konzentration an Cyclonucleotid zur halbmaximalen Stimulierung der cG-Kinase.  $K_a'$  = relative Aktivierungskonstante :  $K_a' = K_a(\text{cGMP})/K_a(\text{Analog})$

| Verbindung                                                  | Butt                 | Corbin et al. <sup>36)</sup> |        |
|-------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------|--------|
|                                                             | $K_a$ (M)            | $K_a'$                       | $K_a'$ |
| 8-Br-cGMP (3)                                               | $8,8 \times 10^{-9}$ | 22,7                         | 4,3    |
| 8-BzS-cGMP (31)                                             | $2,7 \times 10^{-8}$ | 7,2                          | 2,2    |
| 8-Cl-cGMP (2)                                               | $7,3 \times 10^{-8}$ | 2,7                          |        |
| 8-I-cGMP (4)                                                | $9,4 \times 10^{-8}$ | 2,1                          |        |
| 6-SH-cGMP (5)                                               | $6,0 \times 10^{-7}$ | 3,3                          | 1,3    |
| 2-NH <sub>2</sub> -cPuMP (7)                                | $1,0 \times 10^{-7}$ | 2,0                          |        |
| cGMP                                                        | $2,0 \times 10^{-7}$ | 1,0                          | 1,0    |
| 8-SH-cGMP (34)                                              |                      |                              | 0,34   |
| 8-NH <sub>2</sub> -cGMP (36)                                | $8,0 \times 10^{-7}$ | 0,25                         |        |
| 8-OH-cGMP (35)                                              |                      |                              | 0,12   |
| (Sp)-8-Cl-cGMPS (11)                                        | $3,4 \times 10^{-6}$ | 0,057                        |        |
| 2-CF <sub>3</sub> -cBiMP (9)                                | $4,2 \times 10^{-6}$ | 0,047                        |        |
| 2-NH <sub>2</sub> -cAMP (33)                                |                      |                              | 0,03   |
| cBiMP (32)                                                  | $8,5 \times 10^{-6}$ | 0,023                        |        |
| 8-(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> N-cGMP (37) |                      |                              | 0,018  |
| (Sp)-cGMPS (12)                                             | $2,7 \times 10^{-5}$ | 0,0074                       |        |
| cIMP (6)                                                    | $3,0 \times 10^{-5}$ | 0,0066                       | 0,011  |
| cPuMP (8)                                                   | $4,0 \times 10^{-5}$ | 0,005                        |        |
| cAMP                                                        | $3,9 \times 10^{-5}$ | 0,005                        | 0,0037 |
| (Rp)-8-Cl-cGMPS (10)                                        | Antagonist           |                              |        |
| (Rp)-cGMPS (13)                                             | Antagonist           |                              |        |

Im Gegensatz zu den Aktivierungskurven für cAMP und cAMP-Analoga an den cAMP-abhängigen Proteinkinasen I und II <sup>29)</sup> sowie der cGMP-abhängigen Proteinkinase <sup>III, II2)</sup>, bei denen nach Erreichen der maximalen Stimulation die Kurve durch vermehrte Substratzugabe wieder absinkt, was mit einer Besetzung der ATP-Bindungsstellen und der damit verbundenen Inaktivierung des Proteins erklärt wird, zeigen alle cGMP-Derivate einen konstanten Wert nach Erreichen der Maximalgeschwindigkeit des Enzymsatzes (Abb. 36 ).

Das würde bedeuten, daß in der ATP-Bindungsstelle auch molekulare Wechselwirkungsmöglichkeiten zur Base bestehen, die selektiv für Adenin sind, so daß cGMP und cGMP-Derivate bei diesen Konzentrationen nicht gebunden werden.

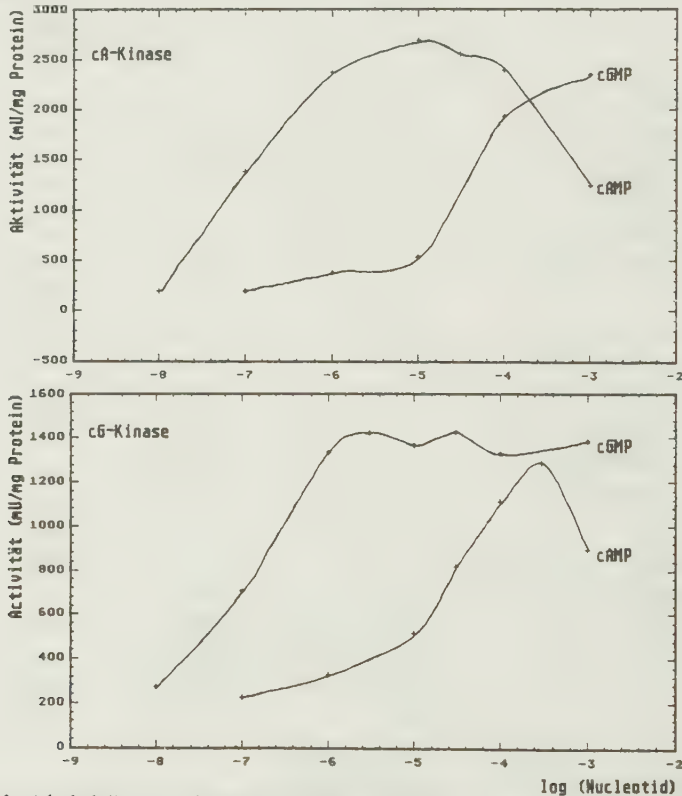


Abb. 36: Aktivitätsprofile für cAMP und cGMP an der cAMP-abhängigen Proteinkinase (oben) und der cGMP-abhängigen Proteinkinase (unten)

#### a) Einfluß von Wasserstoffbrückenbindungen

Die Substitution der Oxo-Gruppe in Position 6 durch Schwefel (Verbindung 5) mit einem reduzierten H-Brücken-Potential hat keinen Einfluß auf die Stimulierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase. Selbst der Wegfall dieser Gruppe, wie im 2-NH<sub>2</sub>-cPuMP, führt zu keiner Verminderung der Aktivität. Wird dagegen die Aminogruppe in Position 2 eliminiert (Verbindung 6), sinkt die Aktivität um den Faktor 150. Das zeigt deutlich, daß die 2-Aminofunktion eine essentielle Wasserstoffbrückenbindung zur cG-Kinase ausbildet. Gestützt wird diese Hypothese auch durch die Derivate cPuMP (8) und cAMP.

Setzt man voraus, daß das Enzym, im Gegensatz zur cA-Kinase, hauptsächlich durch H-Brücken-Bindung des Guaninringes zur Bindungsstelle aktiviert wird, erscheint das Aussparen einer Wechselwirkung zur Oxo-gruppe sinnvoll, da damit die Bindung von cAMP durch dessen Aminofunktion in Position 6 ausgeschlossen wird.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Aussagen von Corbin et al.<sup>36)</sup>, die eine Wasserstoffbrückenbindung zur 6-Oxo-Gruppe postulieren. Allerdings wurden deren Messungen nicht mit einer funktions-reduzierten Verbindung durchgeführt, sondern die Oxo-Gruppe durch eine Aminofunktion ersetzt. Dies führte zu einer Aktivitätsminderung um den Faktor 30. Wir nehmen an, daß hier eher sterische Effekte sowie ein ungünstiges Dipolmoment (siehe Einfluß des Dipolmomentes unten) eine Rolle spielen, da ein Aktivitätsverlust in dieser Größenordnung für eine H-Brücken-Bindung zu gering ist.

#### b) Einfluß von Substituenten in Position 8

Bei einem Vergleich der Verbindungen mit Substituenten in Position 8 fällt auf, daß man zwischen hydrophoben und hydrophilen Verbindungen unterscheiden kann. Alle Verbindungen mit hydrophoben Substituenten (8-Br-cGMP (3), 8-Cl-cGMP (2), 8-I-cGMP (4) und 8-BzS-cGMP) stimulieren die cG-Kinase besser als cGMP. Dabei scheint die Größe des Substituenten relativ unerheblich zu sein. Erst bei zwei Phenylgruppen

sinkt die Aktivität wieder um den Faktor 50. Dagegen führen die Derivate mit den hydrophilen Gruppen 8-SH, 8-NH<sub>2</sub> und 8-OH generell zu einer geringeren Stimulation des Enzyms.

In der Arbeit von Corbin et al. <sup>110)</sup>, die ihre Verbindungen auf site-Selektivität getestet haben, läßt sich die Tendenz erkennen, daß die hydrophoben Reste in Position 8 (mit Ausnahme von 8-Br-cGMP (3)) eine höhere Affinität zur slow-site zeigen, während 8-SH-cGMP und 8-OH-cGMP bevorzugt an die rapid-site binden. Da zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase zuerst die slow-sites besetzt werden, könnte die gesteigerte Affinität der 8-substituierten hydrophoben Reste zu dieser Bindungsstelle deren größere Aktivität erklären.

Wir vermuten, daß sich die Aminosäuren in der slow-site und der rapid-site dahingehend unterscheiden, daß sich bei der slow-site eine hydrophobe Tasche bildet, in die die 8-substituierten hydrophoben Derivate hineinreichen, während die hydrophilen Gruppen leicht abgestoßen werden. Im Gegensatz dazu scheint sich bei der rapid-site eine eher hydrophile Tasche ausgebildet zu haben.

Die Möglichkeit einer Schwächung der Wasserstoffbrückenbindung durch den induktiven Effekt der elektronegativen, hydrophilen Substituenten in Position 8 scheidet aus, da sich die Elektronendichten an der Aminofunktion dadurch nur unwesentlich verändern <sup>38)</sup>.

### c) Einfluß des Dipolmomentes

Moleküle mit stationären elektrischen Dipolmomenten üben aufeinander eine anziehende Wirkung aus, die von ihrer gegenseitigen Orientierung und von der Größe der Dipolmomente abhängt.

Um diesen Einfluß auf die Bindung und Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase zu untersuchen, wurden die Dipolmomente  $\mu$  (in Debye) und die Richtung ausgewählter Basen ohne essentielle Wasserstoffbrückenbindungsmöglichkeiten am Ring berechnet <sup>38)</sup> (Tabelle 5 und Abb. 8).

Tabelle 5: Physiko-chemische Daten ausgewählter Nucleobasen

| Verbindung                        | Winkel -<br>abweichung | Dipolmoment<br>$\mu$ (in Debye) | $K_a$        |
|-----------------------------------|------------------------|---------------------------------|--------------|
| <b>cGMP</b>                       | <b>0°</b>              | <b>5,72</b>                     | <b>1,0</b>   |
| <b>cPuMP (8)</b>                  | <b>+ 80°</b>           | <b>3,10</b>                     | <b>0,005</b> |
| <b>cBiMP (32)</b>                 | <b>+ 34°</b>           | <b>3,11</b>                     | <b>0,023</b> |
| <b>2-CF<sub>3</sub>-cBiMP (9)</b> | <b>- 14°</b>           | <b>4,0</b>                      | <b>0,047</b> |
| <b>2-NH<sub>2</sub>-cAMP (33)</b> | <b>+ 60°</b>           | <b>0,44</b>                     | <b>0,030</b> |
| <b>cAMP</b>                       | <b>+ 129°</b>          | <b>2,03</b>                     | <b>0,005</b> |

Vergleicht man die Werte für cPuMP (8) und cBiMP (32) miteinander, so unterscheiden sich die Nucleobasen der Verbindungen nur in der Orientierung ihrer Dipolmomente. Dabei zeigt cPuMP (8) mit einer Abweichung von 80° eine Reduzierung der Aktivität gegenüber cGMP um den Faktor 200, während cBiMP (32) mit einer Winkeldifferenz von 34° das Enzym nur etwa 40 fach schlechter stimuliert.

Ein noch besseres Derivat ist 2-CF<sub>3</sub>-cBiMP (9) mit einer Richtungsabweichung von nur 14°. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß das Dipolmoment  $\mu$  mit 4,0 D höher ist als bei den vorherigen Derivaten und daß die CF<sub>3</sub>-Gruppe zusätzlich eine hydrophobe Wechselwirkung ausüben kann (siehe 8-substituierte Verbindungen oben).

Interessant ist auch, daß sich 2-NH<sub>2</sub>-cAMP (33) mit der für die Aktivierung wichtigen Aminofunktion in Position 2 aber sehr schlechtem Dipolmoment, in seiner Stimulation kaum von cBiMP (32) ohne NH<sub>2</sub>-Gruppe aber relativ gutem Dipolmoment unterscheidet.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß es, zusätzlich zur Wasserstoffbrückenbindung über die 2-NH<sub>2</sub>-Funktion, eine schwächere Bindung über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Base mit einer entsprechenden, evt. aromatischen, Aminosäure in der Bindungsstelle gibt.

Zur Verifizierung der Aussagen ist es nötig, demnächst site-selektive Bindungs- und Aktivitätsstudien mit den neu synthetisierten Verbindungen an der cGMP-abhängigen Proteinkinase durchzuführen.

#### d) Antagonisten

Mit der Verbindung (Rp)-cAMPS wurde der erste Antagonist für die cAMP-abhängigen Proteinkinasen I und II gefunden <sup>32)</sup>. Auch alle später synthetisierten (Rp)-Diastereomeren inhibieren die für die Aktivierung des Enzyms wichtige Dissoziation in die Untereinheiten <sup>99)</sup>. Der antagonistische Effekt ist auf die equatoriale Stellung des exocyclischen Schwefelatoms zurückzuführen <sup>39,40)</sup>.

An der cGMP-abhängigen Proteinkinase wurden bislang nur (Rp)- und (Sp)-cAMPS getestet <sup>112)</sup>, wobei das (Sp)-Isomere als schwacher Agonist fungiert, während (Rp)-cAMPS die Aktivität des Enzyms mit einem  $K_i$  von 52,5  $\mu$ M antagonisiert.

Dieses Ergebnis ist allerdings nicht geeignet, auf einen generellen antagonistischen Effekt für (Rp)-Isomere zu schließen, da die Derivate insgesamt sehr viel schlechter als cGMP an die cG-Kinase binden und gleichzeitig, bei zu hoher Konzentration, die ATP-Bindungsstelle im Enzym besetzen können.

Daher wurden von uns die Cyclothiophosphate (Rp)- und (Sp)-cGMPS (10,11) sowie (Rp)- und (Sp)-8-Cl-cGMPS (12,13) synthetisiert, deren Cyclophosphate sehr gute Substrate für die cGMP-abhängige Protein-kinase sind

Um eine Aktivierung des Enzyms durch Verunreinigungen mit cGMP zu verhindern (0,01 % cGMP im (Rp)-cGMPS stimulieren die cG-Kinase bei einer (Rp)-Konzentration von  $10^{-3}$  M bereits um 10 %), wurden die (Rp)-cGMPS-Proben vorher mit cPDE inkubiert.

Die (Sp)-Isomeren senken die Aktivität der cGMP-abhängigen Protein-kinase im Vergleich zu cGMP, wobei (Sp)-cGMPS (11) ein schlechterer Aktivator als (Sp)-8-Cl-cGMPS (13) ist (siehe Tabelle 4 und Abb. 36).

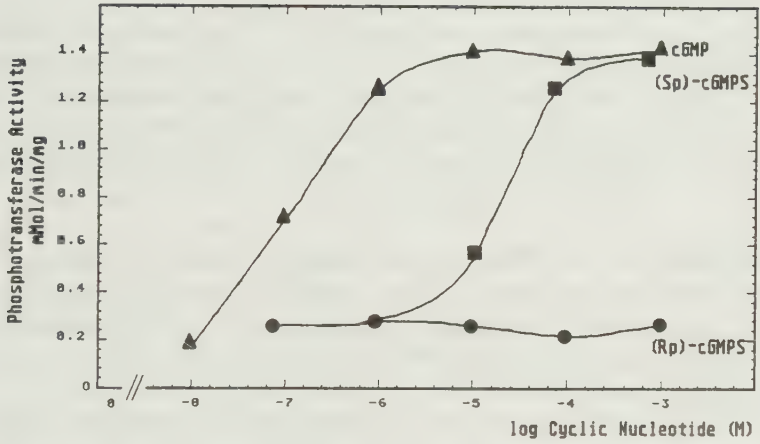


Abb. 37: Aktivierungskurven für cGMP, (Rp)-cGMPS (10) und (Sp)-cGMPS (11)

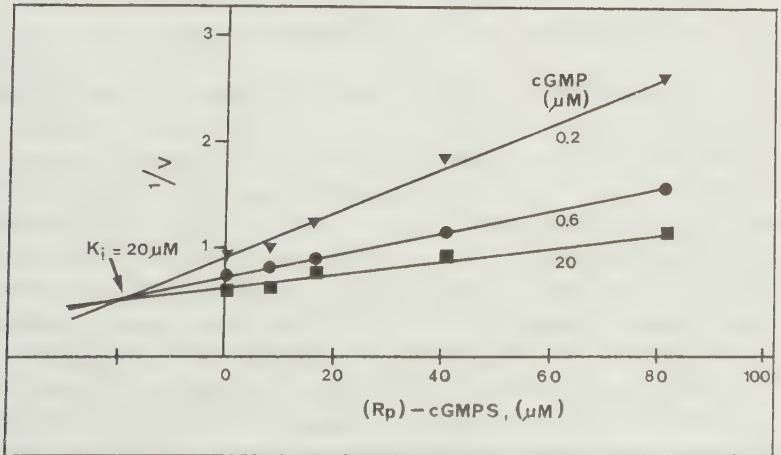


Abb. 38: Dixon Plot für die Inhibition der cGMP-abhängigen Protein-kinase durch (Rp)-cGMPS (10)

Dies ist sicherlich auf die Chlorsubstitution (siehe entsprechende Cyclophosphate oben) zurückzuführen.

Beide (Rp)-Diastereomeren antagonisieren die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase (Abb. 37). Auch hier ist die equatoriale Stellung des exocyclischen Schwefelatoms am Phosphatring ausschlaggebend für die kompetitive Inhibition der cGMP-induzierten Konformationsänderung, die zur Aktivierung des Enzyms führt. Die Inhibitionskonstante für (Rp)-cGMPS (10) beträgt 20  $\mu$ M (Abb. 38).

Eine Erklärung für das differenzierte Verhalten von Cyclophosphaten und Cyclothiophosphaten gibt es bisher nicht. Möglicherweise spielen hier ebenfalls die unterschiedlichen Energiebarrieren für den Übergang vom Tetraeder zur trigonalen Bipyramide am Phosphor eine Rolle, wie sie für die Cyclophosphodiesterase diskutiert werden <sup>105)</sup> (siehe 5.2.).

Bislang konnte jedoch noch nicht bewiesen werden, daß die Konformationsänderung im Protein durch den nucleophilen Angriff einer Aminosäure (wie z.B. Serin oder Threonin) auf den Phosphor und der damit verbundenen Strukturänderung ausgelöst wird.

### 6.3. Überlegungen zu einem Bindungsmodell

Zusammenfassend lassen sich folgende molekulare Wechselwirkungen zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase postulieren:

cGMP wird über eine negative Ladung am Phosphatring sowie drei Wasserstoffbrückenbindungen zu 2'-OH, 3'-O und 5'-O an der Ribose gebunden <sup>36)</sup>. An der Base erfolgt die Bindung über eine Wasserstoffbrückenbindung zur 2-NH<sub>2</sub>-Gruppe und über eine Dipol-Dipol- oder Dipol-induzierte Dipol - Wechselwirkung mit vermutlich aromatischen Aminosäuren aus der Polypeptidkette in der Bindungsstelle.

Vergleicht man die molekularen Wechselwirkungen von cAMP und cGMP mit ihren jeweiligen Proteinkinasen, so kann die Differenzierung nur über ein unterschiedliches Bindungsverhalten der Nucleobasen erfolgen. Adenin wird, im Gegensatz zu Guanin, nicht über Wasserstoffbrückenbindungen, sondern über einen Charge-Transfer-Komplex mit zwei aromatischen Aminosäuren gebunden <sup>35)</sup>.

Ausgehend von einem Vergleich der Aminosäuresequenzen des CAP-Proteins, der cAMP-abhängigen Proteinkinasen I und II sowie der cGMP-abhängigen Proteinkinase <sup>23)</sup>, wurde auf der Grundlage einer Röntgen-Strukturanalyse des CAP-Protein ein Computermodell für die Tertiärstruktur der slow-site in der cA-Kinase I abgeleitet <sup>34)</sup>. Aufgrund der hohen Homologie in den Aminosäuresequenzen für die slow-sites in der cA-Kinase I und der cG-Kinase haben wir die Bindungsstellen in beiden Enzymen mit Kalottenmodellen nachgebaut.

Die Aminosäure Arginin, die im CAP-Protein <sup>113)</sup> eine Ionenbindung zur negativen Ladung am Phosphatring des cAMP ausbildet und Glutaminsäure mit einer Wasserstoffbrückenbindung zur 2'-OH-Gruppe sind in allen bislang analysierten cA-Kinase-Aminosäuresequenzen konserviert und werden ebenfalls für die Bindung des cAMP an die cAMP-abhängige Proteinkinase vorgeschlagen <sup>34,35)</sup>.

Setzt man das cGMP-Molekül mit einer Ionenbindung zum entsprechenden Arg-300 und einer Wasserstoffbrückenbindung zu Glu-291 in das Modell ein, so fällt eine weitere Wasserstoffbrückenbindung von Gln-250 zu 5'-O auf. Auch diese Aminosäure ist in allen Enzymen konserviert. An der Base kann es in dieser Anordnung zu einer Wechselwirkung mit der aromatischen Aminosäure Tyr-335 aus der  $\alpha$ -Helix kommen. In den cA-Kinasen I und II wurden in dieser Position die Aminosäuren Tyr-371 bzw. Tyr-381 über Photoaffinitylabeling in den Bindungstaschen nachgewiesen <sup>114,115)</sup>; sie lassen sich an dieser Stelle auch in allen anderen Enzymen wiederfinden.

Eine zweite aromatische Aminosäure, wie sie für den Charge-Transfer-Komplex zur Bindung von cAMP in den cA-Kinasen vorgeschlagen wird <sup>35)</sup>, ist im Modell nicht zu sehen. Dagegen wird eine Wasserstoffbrückenbindung von Glu-339 zur 2-NH<sub>2</sub>-Funktion beobachtet. Die Aminosäure ist 1<sup>1</sup>/<sub>4</sub> Drehung von Tyr-335 in der  $\alpha$ -Helix entfernt (Abb. 39). An gleicher Stelle finden sich für alle bislang untersuchten cA-Kinasen nur hydrophobe Gruppen wie Valin oder Leucin. Diese Unterschiede könnten das selektive Bindungsverhalten von cAMP und cGMP erklären.

So würde die Base im cAMP in der slow-site der cGMP-abhängigen Proteinkinase nur noch durch Wechselwirkung mit einer aromatischen Aminosäure gebunden und hätte keine Möglichkeit, eine Wasserstoffbrückenbindung zu Gln-250 auszubilden, um die Bindung zu verstärken. Außerdem weichen die Richtungen der Dipolmomente von Adenin und Guanin um fast  $130^\circ$  voneinander ab.

cGMP dagegen würde zwar an der cAMP-abhängigen Proteinkinase durch zwei aromatische Aminosäuren komplexiert, die Bindung wäre aber aufgrund des hohen LUMO-Wertes der Base sehr viel schlechter als für cAMP<sup>38)</sup>. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung ist in der Basenregion an der cA-Kinase nicht möglich<sup>30)</sup>.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der Bindungsstellen für die slow-site und die rapid-site miteinander, so kann man alle Aminosäuren, die eine Bindung zum cGMP in der slow-site ausbilden, mit dem gleichen Abstand zueinander in der rapid-site wiederfinden: Glu-167 mit einer Wasserstoffbrückenbindung zu 2'-OH, Arg-176 mit einer Ionenbindung zum Phosphatrest, Glu-131 mit der Möglichkeit zur Ausbildung einer H-Brücke zum 5'-O und Phe-214 mit einer Dipol-induzierte Dipol Wechselwirkung zur Base. Auch diese Bereiche sind in allen bislang untersuchten cAMP-abhängigen Proteinkinasen konserviert, wobei die Bindung mit der entsprechenden Glutaminsäure zur 2'-Hydroxygruppe, die Wechselwirkung des Phenylalanins mit der Base sowie die Ionenbindung zum Arginin auch für cAMP in den cA-Kinasen angenommen wird<sup>35)</sup>.

Im Gegensatz zur slow-site fehlt in der rapid-site jedoch die Wasserstoffbrückenbindungsmöglichkeit zur 2-NH<sub>2</sub>-Gruppe an der Base. Die Glutaminsäure ist, wie bei den cA-Kinasen, durch Valin ersetzt worden. Damit wäre die höhere Affinität von cGMP zur slow-site und die Besetzung zuerst dieser Bindungsstelle erklärbar.

Eine Wasserstoffbrückenbindung zu 3'-O konnte im Modell zwar beobachtet werden (Glu-339); die Aminosäure gehört jedoch nicht zum konservierten Bereich und hat keinen Gegenpart in der rapid-site.

Erst kürzlich wurde in der Arbeitsgruppe von Tore Jahnsen in Norwegen eine cGMP-abhängige Proteinkinase aus menschlichem Gewebe kloniert <sup>116)</sup>. Wir hoffen, an dieser Kinase demnächst Punktmutationen durchführen zu können, um die aufgestellten Bindungstheorien zu überprüfen.

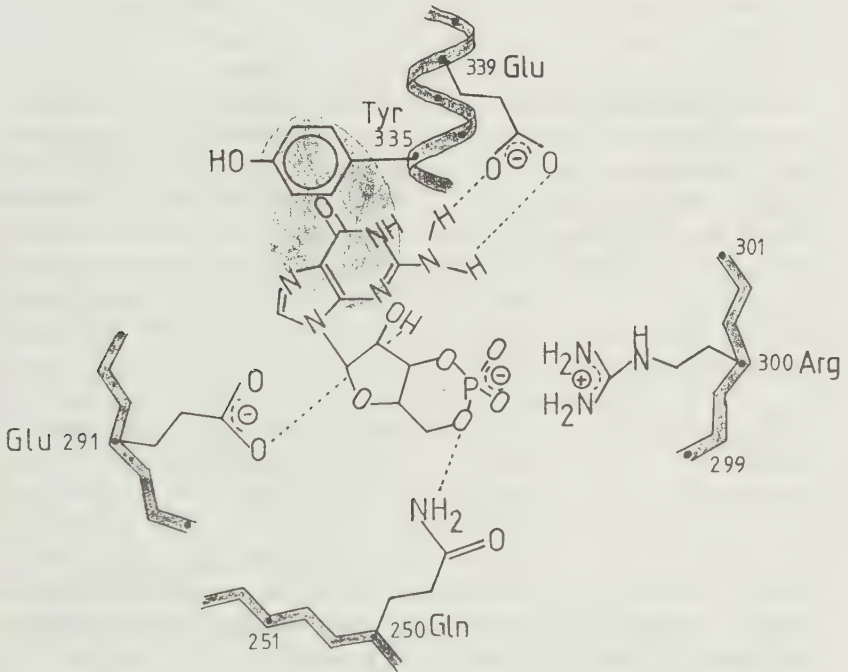


Abb.39: Modell für die molekularen Wechselwirkungen von cGMP mit der slow-site der cGMP-abhängigen Proteinkinase

## 7. AUSBLICK

Die biochemischen Studien dieser Arbeit haben gezeigt, daß es möglich ist mit einigen systematisch ausgewählten Cyclonucleotiden die molekularen Wechselwirkungen zwischen Substrat und Rezeptor an der Phosphodiesterase und der cGMP-abhängigen Proteinkinase näher zu charakterisieren.

Unter Berücksichtigung der Daten für die Lipophilie, die Hydrolysestabilität gegenüber einer cPDE und die Aktivierung der cG-Kinase kann von Verbindungen wie 8-BzS-cGMP und 8-I-cGMP (4) erwartet werden, daß sie aufgrund ihrer hohen Lipophilie die Zellmembran durchdringen und die cGMP-abhängige Proteinkinase stimulieren ohne abgebaut zu werden. Damit kommt ihnen eine potentielle pharmakologische Bedeutung zu. Zusätzlich ergibt sich mit dem lipophilen Antagonisten (Rp)-8-Cl-cGMPS (12) die Möglichkeit, cGMP-abhängige Regulationsmechanismen in der Zelle zu untersuchen.

Offen blieb bei den cPDE - Studien die Frage nach dem unterschiedlichen Verhalten von 8-substituierten cAMP- und cGMP-Derivaten. Dazu wäre es sinnvoll, die Verbindungen 8-CF<sub>3</sub>-cAMP und 8-CF<sub>3</sub>-cGMP zu synthetisieren. Im Vergleich mit 2-CF<sub>3</sub>-cBiMP (9) könnte geklärt werden, ob die Hydrolysestabilität auf große Substituenten in Position 8 zurückzuführen ist oder eher auf ein differenziertes Bindungsverhalten für Guanin- und Adenin-Basen. Außerdem müßten Bindungsstudien mit allen neuen Derivaten durchgeführt werden.

Nach den Messungen zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase mit den synthetisierten Cyclophosphaten und Cyclothiophosphaten sollten site-selektive Bindungsstudien folgen, um z.B. die aufgestellte Theorie über eine hydrophobe slow-site und eine hydrophilere rapid-site zu überprüfen.

Erst durch die vollständige Aufklärung der molekularen Wechselwirkungen zwischen Substrat und Rezeptor wird es möglich sein, gezielt Verbindungen wie z.B. einen besseren Agonisten zu synthetisieren.

## 8. EXPERIMENTELLER TEIL

### 8.1. Allgemeine Versuchsbedingungen

#### 8.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

8-Bromguanosin, Phenylendiamin, Purinribosid, 2-Amino-6-mercaptopurinribosid, Inosin und 6-Mercaptoguanosin waren von Sigma Chemie. 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan und Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (Triflate) waren von Janssen Chimica. KF/CaF war von Aldrich. 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranose wurde von Fluka bezogen. Jod, KF, AgBF<sub>4</sub>, 80 % Hydrazinlösung und 18-Krone-6 waren von Merck. Tris(dimethylamino)sulfonium-difluoro-trimethylsilicat (TASF) war ein Geschenk der Arbeitsgruppe Mews (Universität Bremen). Alle anderen Chemikalien waren in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Die verwendeten Lösungsmittel Triethylphosphat, Phosphorylchlorid und Thiophosphorylchlorid wurden für die Reaktionen destilliert.

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. Qualität eingesetzt.

#### 8.1.2. Chromatographische Methoden

Die High - Performance - Liquid - Chromatography (HPLC) - Analysen wurden mit einer LDC Constametric (Model III) und einem LDC - Detektor (UV III Monitor) mit feststehender Wellenlänge bei 254 nm ausgeführt.

Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 60 HPLC C-18 Reverse Phase, Korngröße 10  $\mu$ m, von Riedel DeHaen verwendet. Die Stahlsäule hatte einen Durchmesser von 4mm und eine Füllhöhe von 25 cm.

Die Flash-Chromatographie-Trennungen wurden auf einer selbstgepackten Säule (Füllhöhe 3 x 25 cm) mit Kieselgel 60 HPLC C-8 Reverse Phase, Korngröße 25-40  $\mu$ m, von Riedel DeHaen, durchgeführt und über einen Serva Chromatocord 254 Detektor mit Durchflußküvette und Recorder verfolgt.

Der 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer (TEAF-Puffer) wurde durch Lösen von über  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gereinigtem Triethylamin und 98 % Ameisensäure in Wasser hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes auf 6,5 erfolgte mit Ameisensäure.

### 8.1.3. Spektroskopische Methoden

Die UV-Spektren wurden mit einem Perkin Elmer Spektralphotometer (Modell 554) in Methanol oder Wasser aufgenommen.

Die Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT (Modell 8222) der Firma Varian MAT aufgenommen. Es wurde nach der Fast-Atom-Bombardment-Methode gemessen.

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker WH-360 in  $\text{DMSO-d}_6$  oder  $\text{D}_2\text{O}$  gemessen. Als Referenzsubstanzen dienten für die Kerne  $^1\text{H}$ : TMS (extern) und  $^{32}\text{P}$ :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %). Die in ppm angegebenen Verschiebungswerte sind auf den jeweiligen Standard bezogen. Werte mit positivem Vorzeichen bedeuten Tieffeldverschiebung gegenüber dem Referenzsignal. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben. Alle  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren sind protonenentkoppelt aufgenommen worden.

### 8.1.4. Weitere Arbeitsmethoden

Lyophilisiert wurde mit einem Gefriertrockner Leybold-Heraeus GT 2. Die Ausbeuten wurden UV-spektroskopisch über die optische Dichte (OD) bestimmt.

### 8.1.5. Computer-Programme

Die Graphiken wurden mit dem Public Domain Programm „Meßwertanalyse“ von Jürgen Altmann auf einem Atari 1040 ST erstellt.

Die MNDO-Daten wurden mit dem Quantum Chemistry Program Exchange (QCPE – Programm) Nr. 464 von J.P. Stewart, Dewar Group, University of Texas, Austin, Texas 78712 auf einem Siemens Rechner 7880 berechnet <sup>117)</sup>.

## 8.2. Synthese von 8-Bromguanosin-3',5'-cyclophosphat (3)

0,183 g (0,5 mMol) 8-Bromguanosin (14) wurden in 7,5 ml Triethylphosphat gelöst und die Lösung im Eisbad abgekühlt. Dazu gab man 100 µl (1,1 mMol)  $\text{POCl}_3$  und rührte 2 Std. bei  $0^\circ\text{C}$ . Den Reaktionsverlauf kontrollierte man durch regelmäßige HPLC-Messungen, (7,5 %  $\text{CH}_3\text{CN}/100\text{ mM TEAF-Puffer}$ ) für die 10 µl der Reaktionslösung mit 200 µl  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und 10 Min. hydrolisiert wurden.

Nach Beendigung der Reaktion tropfte man den Reaktionsansatz schnell unter Eiskühlung in eine Lösung aus 6 ml 1 N KOH, 36 ml Acetonitril und 18 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Nach 30 Sek. wurde die Lösung mit 6 N HCl auf pH 6,5 eingestellt.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer eingengt, 2 x mit Ether ausgeschüttelt, in 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und lyophilisiert.

Die Reinigung erfolgte durch zweimalige Flash-Chromatographie mit zuerst 10 %  $\text{CH}_3\text{CN}/100\text{ mM TEAF-Puffer}$  und anschließend mit 8 %  $\text{CH}_3\text{CH}/100\text{ mM TEAF-Puffer}$ . Das Produkt (1) eluierte mit Fraktion 9 und wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 0,054 g (0,127 mMol, 25,4 % d. Th.)

MG:  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrN}_5\text{O}_7$  - 424,1 g

UV:  $\lambda_{\text{max}} = 258\text{ nm}$ ,  $\epsilon = 15.100^{56)}$

HPLC:  $t_R = 7,50\text{ Min.}$  (7,5 %  $\text{CH}_3\text{CN} / 100\text{ mM TEAF-Puffer}$ )

$^{31}\text{P}$ -NMR: Singulett bei -1,83 ppm (in  $\text{DMSO-d}_6$ )

$^1\text{H}$ -NMR: siehe Tabelle 6 (in  $\text{DMSO-d}_6$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 424 : 18\% (\text{M}+\text{H})^+$

negative mode

$m/z = 422 : 20\% (\text{M}-\text{H})^-$

$m/z = 344 : 5\% (\text{M}-\text{Br}-\text{H})^-$

$m/z = 228 : 18\% (\text{B}-\text{H})^-$

$m/z = 150 : 3\% (\text{B}-\text{Br}-\text{H})^-$

### 8.2.1. 8-Bromguanin

Das bei der Synthese von 8-Br-cGMP (3) entstandene Nebenprodukt 8-Bromguanin wurde bei der Flash-Chromatographie mit Fraktion 2 eluiert.

Ausbeute : 0,173 mg (0,075 mMol, 15 % d. Th.)

MG:  $C_5H_4BrN_5O$  - 230,0 g

UV:  $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 15.100$  <sup>56)</sup>

HPLC:  $t_R = 3,20 \text{ Min.}$  (7,5 %  $CH_3CN$  / 100 mM TEAF-Puffer)

FAB-MS: negative mode

$m/z = 230 : 10 \%$   $(M-H)^-$

### 8.2.2. 8-Bromguanosin-5'-phosphat

Das bei der Synthese von 8-Br-cGMP (3) gebildete Nebenprodukt 8-Bromguanosin-5'-phosphat wurde bei der Reinigung mit Fraktion 1 abgetrennt.

Ausbeute: 64 mg (0,015 mMol, 29 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{13}BrN_5O_8P$  - 442,1 g

UV:  $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 15.100$  <sup>56)</sup>

HPLC:  $t_R = 2,55 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

FAB-MS: negative mode

$m/z = 442 : 20 \%$   $(M-H)^-$

$m/z = 362 : 10 \%$   $(M-Br-H)^-$

$m/z = 228 : 2 \%$   $(B-H)^-$

$m/z = 150 : 3 \%$   $(B-Br-H)^-$

### 8.3.      **Synthese von 8-Chlorguanosin-3',5'-cyclophosphat (2)**

0,072 g (0,2 mMol) getrocknetes 8-Bromguanosin (14) wurden unter leichtem Erwärmen in 1,5 ml Triethylphosphat gelöst, auf 0°C abgekühlt, mit 40 µl (0,44 mMol) POCl<sub>3</sub> versetzt und unter Eiskühlung 2 Std. gerührt. Anschließend wurden zur Chlorierung weitere 20 µl (0,22 mMol) Phosphorylchlorid zu der Reaktionslösung gegeben und insgesamt 8 Std. bei 0°C weitergerührt. Den Reaktionsverlauf kontrollierte man durch HPLC-Messungen (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer), für die 10 µl Lösung mit 200 µl H<sub>2</sub>O versetzt wurden.

Der Reaktionsansatz wurde nach Beendigung der Reaktion schnell unter Eiskühlung in eine Lösung aus 3 ml 1 N KOH, 18 ml CH<sub>3</sub>CN und 9 ml H<sub>2</sub>O getropft und nach 30 Sek. mit 6 N HCl auf pH 6,5 eingestellt.

Nach dem Einengen der Reaktionslösung wurde der Rückstand 2 x mit Ether ausgeschüttelt, in 20 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Trennung und Reinigung erfolgte durch zweimalige Flash-Chromatographie mit einer Laufmittelkonzentration von 7,5 % MeOH/100 mM TEAF - Puffer. Das Produkt (2) eluierte mit Fraktion 8 und wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 17,46 mg (0,046 mMol, 23 % d. Th.)

MG: C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>7</sub> - 379,6 g

UV: λ<sub>max</sub>: 256 nm, ε = 15.500 (bei pH 1) <sup>53)</sup>

HPLC: t<sub>R</sub> = 7,20 Min (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer)

<sup>31</sup>P-NMR: Singulett bei -1,96 ppm (in DMSO-d<sub>6</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR: siehe Tabelle 6 (in DMSO-d<sub>6</sub>)

FAB-MS: positive mode

m/z = 380 : 20 % (M+H)<sup>+</sup>

negative mode

m/z = 378 : 70 % (M-H)<sup>-</sup>

m/z = 344 : 10 % (M-Cl-H)<sup>-</sup>

m/z = 150 : 20 % (B-H)<sup>-</sup>

### 8.3.1. 8-Chlorguanosin-5'-phosphat

Bei der Synthese von 8-Chlorguanosin-3',5'-cyclophosphat (2) konnte mit Fraktion 2 das Nebenprodukt 8-Chlorguanosin-5'-phosphat isoliert werden.

Ausbeute: 23,8 mg (0.06 mMol, 30 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{13}ClN_5O_8P$  - 397,6 g

UV:  $\lambda_{\max}$ : 256 nm,  $\epsilon = 15.500$  (bei pH 1) <sup>53)</sup>

HPLC:  $t_R = 2,50$  Min (7,5 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

FAB-MS: negative mode

$m/z = 396 : 60 \% (M-H)^-$

$m/z = 362 : 20 \% (M-Cl-H)^-$

$m/z = 184 : 20 \% (B-H)^-$

$m/z = 150 : 7 \% (B-Cl-H)^-$

### 8.4. Synthese von 8-Mercaptoguanosin (15)

1,5 g (4,7 mMol) 8-Bromguanosin (14) wurden in 60 ml Methanol suspendiert und mit 0,6 g (7,9 mMol) Thioharnstoff versetzt. Die Lösung wurde 6 Std. unter Rückfluß erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Die ausgefallenen Kristalle wurden abfiltriert und aus  $H_2O$  umkristallisiert.

Ausbeute: 0.725 g (2,3 mMol, 49 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{13}N_5O_5S$  - 315,2 g

UV:  $\lambda_{\max} = 296, 286, 228$  nm,  $\epsilon = 7.600$  bei 286 nm <sup>56)</sup>

HPLC:  $t_R = 4,00$  Min (7,5 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

### 8.5.      Synthese von 8-Iodguanosin (16)

0,6 g (1,9 mMol) 8-Mercaptoguanosin (15) wurden in 30 ml H<sub>2</sub>O suspendiert. Die Reaktionslösung wurde mit 1,8 g (17 mMol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,2 g (7 mMol) KI sowie 1,8 g (7 mMol) I<sub>2</sub> versetzt und bei RT 2 Std gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte über HPLC (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer).

Nach Beendigung der Reaktion wurde der ausgefallene braune Niederschlag abfiltriert, mit 20 ml 10 % KI-Lösung gewaschen und in wenig heißem Wasser gelöst. Zu der Lösung gab man einige Tropfen konz. Ammoniaklg. bis zur Entfärbung des Reaktionsansatzes. Anschließend wurde mit Essigsäure auf pH 6 eingestellt und die beim Abkühlen ausgefallenen Kristalle abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 0,42 g (1 mMol, 52 % d. Th.)

MG: C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>5</sub> - 409,1 g

UV:  $\lambda_{\max}$  = 262 nm,  $\epsilon$  = 18.300 <sup>58)</sup>

HPLC: t<sub>R</sub> = 7,40 Min. (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer)

### 8.6.      Synthese von 8-Iodguanosin -3',5'-cyclophosphat (4)

0,08 g (0,2 mMol) trockenes 8-Iodguanosin (16) wurden in 3 ml Triethylphosphat gelöst, im Eisbad abgekühlt, mit 40 µl Phosphorylchlorid versetzt und 6 Std. bei 0° C gerührt. Den Reaktionsverlauf kontrollierte man durch regelmäßige HPLC-Messungen (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer) für die 10 µl der Reaktionslösung mit 200 µl H<sub>2</sub>O hydrolisiert wurden.

Nach Beendigung der Reaktion tropfte man den Reaktionsansatz schnell unter Eiskühlung in eine Lösung aus 3 ml 1 N KOH, 18 ml CH<sub>3</sub>CN und 9 ml H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde mit 6 N HCl auf pH 6,5 eingestellt und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde 2 x mit Ether ausgeschüttelt, in 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und lyophilisiert.

Die Trennung und Reinigung erfolgte über zweimalige Flash-Chromatographie mit 8 % MeOH/100 mM TEAF-Puffer. Das Produkt eluierte mit Fraktion 6 und wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 20,7 mg (0,044 mMol, 22 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{11}IN_5O_7$  - 471,0 g

UV:  $\lambda_{\max} = 262 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 18.300$  <sup>58)</sup>

HPLC:  $t_R = 8,20 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

$^{31}P$ -NMR: Singulett bei -2,24 ppm (in  $DMSO-d_6$ )

$^1H$ -NMR: siehe Tabelle 6 (in  $DMSO-d_6$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 472 : 22 \% (M+H)^+$

$m/z = 346 : 10 \% (M-I+H)^+$

$m/z = 278 : 4 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 562 : 8 \% (M-H+Gly)^-$

$m/z = 470 : 100 \% (M-H)^-$

$m/z = 344 : 65 \% (M-I-H)^-$

$m/z = 276 : 20 \% (B-H)^-$

#### 8.6.1 . 8-Iodguanosin-5'-phosphat

Das bei der Synthese von 8-I-cGMP (4) gebildete Nebenprodukt 8-Iodguanosin-5'-phosphat konnte bei der Trennung mit Fraktion 3 isoliert werden.

Ausbeute: 19,5 mg (0,04 mMol, 20 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{13}IN_5O_8P$  - 489,0 g

UV:  $\lambda_{\max} = 262 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 18.300$  <sup>58)</sup>

HPLC:  $t_R = 3,10 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

$^{31}\text{P}$ -NMR: Singulett bei 0,4 ppm (in DMSO- $d_6$ )

FAB-MS: negative mode

$m/z = 488 : 20 \% (\text{M-H})^-$

$m/z = 362 : 18 \% (\text{M-I-H})^-$

$m/z = 275 : 5 \% (\text{B-H})^-$

### 8.7.      **Synthese von 6-Mercaptoguanosin-3',5'-cyclophosphat (5)**

0,149 g (0,5 mMol) getrocknetes 6-Mercaptoguanosin (**18**) wurden in 5 ml Triethylphosphat gelöst und anschließend unter Eiskühlung mit 100  $\mu\text{l}$  (1,1 mMol) Phosphorylchlorid versetzt und bei 0°C 0,5 Std. gerührt. Die Reaktion wurde über HPLC (7,5 %  $\text{CH}_3\text{CN}/100 \text{ mM TEAF-Puffer}$ ) verfolgt, indem man 10  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung in 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  hydrolysierte.

Nach Beendigung der Phosphorylierung wurde der Reaktionsansatz unter Eiskühlung in eine Lösung aus 6 ml 1 N KOH, 36 ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  und 18 ml  $\text{H}_2\text{O}$  getropft. Anschließend wurde mit 6 N HCl neutralisiert, am Rotationsverdampfer eingengt, 2 x mit Ether ausgeschüttelt, in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Der Ansatz wurde über Flash-Chromatographie mit 5 % MeOH/50 mM TEAF-Puffer getrennt. Das Produkt eluierte mit Fraktion 5 und wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 104 mg (0,29 mMol, 58 % d. Th.)

MG:  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6\text{PS} - 361,2 \text{ g}$

UV:  $\lambda_{\text{max}} = 257, 342 \text{ nm}, \quad \epsilon = 8.820, 24.800 \text{ }^{61)}$

HPLC:  $t_R = 4,50 \text{ Min}$  (7,5 %  $\text{CH}_3\text{CN}/100 \text{ mM TEAF-Puffer}$ )

$^{31}\text{P}$ -NMR: Singulett bei -0,8 ppm (in  $\text{D}_2\text{O}$ )

$^1\text{H}$ -NMR: siehe Tabelle 6 (in  $\text{D}_2\text{O}$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 362 : 23 \% (M+H)^+$

$m/z = 168 : 5 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 360 : 20 \% (M-H)^-$

$m/z = 166 : 7 \% (B-H)^-$

#### 8.7.1. 6-Mercaptoguanosin-5'-phosphat

Das bei der Synthese von 6-SH-cGMP (5) entstandene Nebenprodukt 6-Mercaptoguanosin-5'-phosphat wurde bei der Reinigung mit Fraktion 2 abgetrennt.

Ausbeute: 66 mg (0,17 mMol, 35 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{14}N_5O_7PS$  - 379,2 g

UV:  $\lambda_{max} = 257, 342 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 8.820, 24.800$  <sup>61)</sup>

HPLC:  $t_R = 2,30 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN/100 \text{ mM TEAF-Puffer}$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 380 : 20 \% (M+H)^+$

$m/z = 168 : 30 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 378 : 60 \% (M-H)^-$

$m/z = 166 : 20 \% (B-H)^-$

#### 8.7.2. 5'-Chlor-6-mercaptoguanosin

Das bei der Darstellung von 6-SH-cGMP (5) ebenfalls gebildete Nebenprodukt 5'-Chlor-6-mercaptoguanosin konnte mit Fraktion 6 isoliert und charakterisiert werden.

Ausbeute: 6 mg (0,019 mMol, 3,8 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{12}ClN_5O_3S$  - 317,7 g

UV:  $\lambda_{max} = 257, 342 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 8.820, 24.800$  <sup>61)</sup>

HPLC:  $t_R = 9,03 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN/100 \text{ mM TEAF-Puffer}$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 318 : 20 \% (M+H)^+$

$m/z = 168 : 50 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 316 : 60 \% (M-H)^-$

$m/z = 166 : 80 \% (B-H)^-$

### 8.8. Synthese von Inosin-3',5'-Cyclophosphat (6)

0,0536 g (0,2 mMol) trockenes Inosin wurden in 2 ml Triethylphosphat gelöst, unter Eiskühlung mit 40 µl  $POCl_3$  versetzt und 4 Std. bei 0°C gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde durch HPLC-Messungen (7,5 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer) verfolgt, indem man 10 µl des Ansatzes mit 200 µl  $H_2O$  hydrolisierte.

Nach Reaktionsende wurde der Reaktionsansatz unter Eiskühlung in eine Lösung aus 2,4 ml 1 N KOH, 14,4 ml  $CH_3CN$  und 7,2 ml  $H_2O$  getropft, mit HCL neutralisiert und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde 2 x mit Ether ausgeschüttelt, in 20 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Die Trennung und Reinigung erfolgte über Flash-Chromatographie mit 5 % MeOH/100 mM TEAF-Puffer als Laufmittel. Das Produkt (5) konnte mit Fraktion 3 eluiert werden.

Ausbeute: 19 mg (0,058 mMol, 29 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{11}N_4O_7P$  - 330,2 g

UV:  $\lambda_{max} = 250 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 12.000$  <sup>118)</sup>

HPLC:  $t_R = 3,50 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

$^{31}P$ -NMR: Singulett bei -0,9 ppm (in  $D_2O$ )

$^1H$ -NMR: siehe Tabelle 6 (in  $D_2O$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 331 : 30 \% (M+H)^+$

$m/z = 137 : 80 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 329 : 100 \% (M-H)^-$

$m/z = 135 : 32 \% (B-H)^-$

### 8.8.1. Inosin-5'-phosphat

Das bei der Darstellung von cIMP (6) gebildete Nebenprodukt Inosin-5'-phosphat konnte bei der Trennung mit Fraktion 1 isoliert werden.

Ausbeute: 28 mg (0.08 mMol, 41 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{13}N_4O_8P$  - 348,1 g

UV:  $\lambda_{\max} = 250 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 12.000$  <sup>118)</sup>

HPLC:  $t_R = 2,30 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN/100 \text{ mM TEAF-Puffer}$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 349 : 30 \% (M+H)^+$

$m/z = 137 : 100 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 347 : 100 \% (M-H)^-$

$m/z = 135 : 75 \% (B-H)^-$

### 8.8.2. 5'-Chlorinosin

Das bei der Synthese von cIMP (6) entstandene Nebenprodukt 5'-Chlorinosin konnte bei der Reinigung mit Fraktion 4 isoliert werden.

Ausbeute: 9 mg (0,03 mMol, 16 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{11}ClN_4O_4$  - 286,4 g

UV:  $\lambda_{\max} = 250 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 12.000$  <sup>118)</sup>

HPLC:  $t_R = 7,20 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN/100 \text{ mM TEAF-Puffer}$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 287 : 45 \% (M+H)^+$

$m/z = 137 : 40 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 285 : 43 \% (M-H)^-$

$m/z = 135 : 30 \% (B-H)^-$

### 8.9.      **Synthese von 2-Aminopurinribosid (17)**

1 g (3,3 mMol) 6-Mercaptoguanosin (18) wurden in 50 ml siedendem H<sub>2</sub>O gelöst und mit 2 g frisch aktiviertem Raney Nickel versetzt. Es setzte sofort eine heftige Reaktion ein. Nach 2 Std. war die Hydrierung beendet. Das Nickel wurde mit einem Cellulose-Filter abgetrennt. Anschließend wurde das Filtrat lyophilisiert und der Rückstand aus abs. Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0,72 g    (2,7 mMol,    82 % d. Th.)

MG: C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> - 267,0 g

UV:  $\lambda_{\max}$  = 308, 246 nm,     $\epsilon$  = 6.900 <sup>61)</sup>

HPLC: 6.50 Min    (5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer)

FAB-MS: positive mode

m/z = 268 : 40 % (M+H)<sup>+</sup>

m/z = 136 : 60 % (B+H)<sup>+</sup>

negative mode

m/z = 266 : 15 % (M-H)<sup>-</sup>

m/z = 134 : 75 % (B-H)<sup>-</sup>

### 8.10.      **Synthese von 2-Aminopurinribosid -3',5'-cyclophosphat (7)**

0,08 g (0,3 mMol) trockenes 2-Aminopurinribosid (17) wurden in 2,5 ml Triethylphosphat gelöst, im Eisbad gekühlt, mit 60 µl (0,66 mMol) Phosphorylchlorid versetzt und 2,5 Std bei 0° C gerührt.

Die Reaktionskontrolle erfolgte über HPLC - Messungen (6 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer), für die man 10 µl der Reaktionslösung mit 200 µl H<sub>2</sub>O hydrolysierte.

Nach Beendigung der Reaktion wurde der Reaktionsansatz unter Eiskühlung in eine Lösung aus 3,6 ml 1 N KOH, 21,6 ml CH<sub>3</sub>CN und 10,8 ml H<sub>2</sub>O getropft und anschließend mit 6 N HCl neutralisiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt, 2 x mit Ether ausgeschüttelt und lyophilisiert.

Die Trennung des Reaktionsansatzes erfolgte über Flash-Chromatographie mit 6 % MeOH/100 mM TEAF-Puffer). Das Produkt (7) eluierte mit Fraktion 6 und wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 41 mg (0,126 mMol, 42 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{12}N_5O_6P$  - 329,1 g

UV:  $\lambda_{\max} = 308, 246 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 6.900^{61)}$

HPLC:  $t_R = 7,00 \text{ Min}$  (6 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

$^{31}P$ -NMR: Singulett bei -1,6 ppm (in  $DMSO-d_6$ )

$^1H$ -NMR: siehe Tabelle 6 (in  $DMSO-d_6$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 330 : 15 \% (M+H)^+$

negative mode

$m/z = 328 : 68 \% (M-H)^-$

#### 8.10.1. 2-Aminopurinribosid-5'-phosphat

Das bei der Synthese von 2-NH<sub>2</sub>-cPuMP (7) entstandene Nebenprodukt 2-Aminopurinribosid-5'-phosphat konnte bei der Trennung mit Fraktion 2 abgetrennt und charakterisiert werden.

Ausbeute: 46 mg (0,135 mMol, 45 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{14}N_5O_7P$  - 346,9 g

UV:  $\lambda_{\max} = 246, 308 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 6.900^{61)}$

HPLC:  $t_R = 2,58 \text{ Min}$  (6 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

$^{31}P$ -NMR: Singulett bei 1,15 ppm (in  $DMSO-d_6$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 348 : 60 \% (M+H)^+$

$m/z = 136 : 40 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 346 : 100 \% (M-H)^-$

$m/z = 134 : 45 \% (B-H)^-$

### 8.11. Synthese von Purinribosid-3',5'-cyclophosphat (8)

0,0502 g (0,2 mMol) trockenes Purinribosid wurden unter leichtem Erwärmen in 2 ml Triethylphosphat gelöst, im Eisbad abgekühlt, mit 40  $\mu$ l  $POCl_3$  versetzt und bei 0° C 1 Std. gerührt. Den Reaktionsverlauf kontrollierte man durch HPLC - Messungen (7,5 %  $CH_3CN/100$  mM TEAF-Puffer), für die 10  $\mu$ l der Lösung mit 200  $\mu$ l  $H_2O$  hydrolisiert wurden.

Der Reaktionsansatz wurde nach Beendigung der Reaktion unter Eiskühlung in eine Lösung aus 2,4 ml 1 N KOH, 7,2 ml  $H_2O$  und 14,4 ml  $CH_3CN$  getropft und nach 30 Sek. mit 6 N HCl auf pH 6,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt, 2 x mit Ether ausgeschüttelt und lyophilisiert.

Die Trennung erfolgte über Flash-Chromatographie mit 5 % MeOH/100 mM TEAF-Puffer. Das Produkt eluierte mit Fraktion 2 und wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 19 mg (0,052 mMol, 26 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{11}N_4O_6P$  - 314,1 g

UV:  $\lambda_{max} = 261$  nm,  $\epsilon = 8.000$  <sup>118)</sup>

HPLC:  $t_R = 5,50$  Min (7,5 %  $CH_3CN/100$  mM TEAF-Puffer)

$^{31}P$ -NMR: Singulett bei -0,95 ppm (in  $D_2O$ )

$^1H$ -NMR: siehe Tabelle 6 (in  $D_2O$ )

FAB-MS: positive mode

$m/z = 315 : 38 \% (M+H)^+$

$m/z = 121 : 44 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 313 : 100 \% (M-H)^-$

$m/z = 119 : 30 \% (B-H)^-$

### 8.11.1. Purinribosid-5'-phosphat

Das bei der Synthese von cPuMP (8) gebildete Nebenprodukt Purin-ribosid-5'-phosphat konnte durch die Trennung mit Fraktion 1 isoliert werden.

Ausbeute: 28 mg (0,084 mMol, 42 % d. Th.)

MG:  $C_{10}H_{13}N_4O_7P$  - 332,1 g

UV:  $\lambda_{\max} = 261 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 8.000$  <sup>118)</sup>

HPLC:  $t_R = 2,25 \text{ Min}$  (7,5 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

FAB-MS: positive mode

$m/z = 333 : 10 \% (M+H)^+$

$M/z = 121 : 5 \% (B+H)^+$

negative mode

$m/z = 331 : 65 \% (M-H)^-$

$m/z = 119 : 20 \% (B-H)^-$

### 8.12. Synthese von 2- $CF_3$ -Benzimidazol (19)

10,8 g (0,1 Mol) Phenylendiamin und 7,4 ml Trifluoressigsäure wurden in 200 ml 4 N HCl gelöst und 3 Std. unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktion wurde über HPLC-Messung (22 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer) verfolgt.

Der ausgefallene weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit  $H_2O$  gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 11,29 g (60 mMol, 60 % d. Th.)

MG:  $C_8H_5F_3N_3$  - 186,13 g

UV:  $\lambda_{\max} = 280, 272, 265, 246-252 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 5.130, 6170, 5750, 5130$  <sup>69)</sup>

HPLC:  $t_R = 10,50 \text{ Min}$  (22 %  $CH_3CN$ /100 mM TEAF-Puffer)

$^1\text{H-NMR}$ : (in  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  10,33 (s,  $\text{H}_3$ ), 7,43 (m,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ), 7,9 (s,  $\text{H}_7$ ), 7,58 (s,  $\text{H}_4$ )

EI-MS:  $m/z$  = 186

**8.13.     Synthese von 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazolribosid-2',3',5'-tri-O-benzoat (22) - (Silylierung, Ribosidierung)**

9,3 g (50 mMol) 2- $\text{CF}_3$ -Benzimidazol (**19**) wurden in 104 ml Hexamethyldisilazan suspendiert und mit 5,3 ml (50 mMol) Trimethylchlor-silan versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 4 Std. unter Rückfluß erhitzt, bis die Lösung nach dem Abkühlen klar blieb. Anschließend wurden unter  $\text{N}_2$ -Schutzgasatmosphäre die überschüssigen Lösungsmittel abgezogen. Den braunen sirupartigen Rückstand löste man in 150 ml trockenem Dichlormethan und versetzte die Lösung mit 25,2 g (50 mMol) 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranose und 9,65 ml Trimethylsilyltrifluormethansulfonat. Die Reaktionslösung wurde 3 Std. unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre und Rückfluß erhitzt. Den Reaktionsverlauf kontrollierte man durch HPLC-Messungen (85 % MeOH). Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz mit 100 ml Dichlormethan verdünnt, mit 200 ml eiskalter, gesättigter  $\text{KHCO}_3$ -Lsg. ausgeschüttelt und die org. Phase am Rotationsverdampfer eingengt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 24,31 g    (38,56 mMol,    77 % d. Th.)

MG:  $\text{C}_{34}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7$  - 630,58 g

UV:  $\lambda_{\text{max}}$  = 281, 274, 266, 246-252 nm,     $\epsilon$  = 5.130, 6.170, 5.750, 5.130 <sup>69)</sup>

HPLC:  $t_R$  = 5,00 Min    (85 % MeOH)

#### 8.14.     **Synthese von 2-CF<sub>3</sub>-Benzimidazolribosid (23)**             **(Schutzgruppenabspaltung )**

24 g (38 mMol) 2-CF<sub>3</sub>-Benzimidazolribosid-2',3',5'-tri-O-benzoat (22) wurden in 400 ml mit Ammoniak gesättigter Methanollösung suspendiert und 24 Std. bei RT gerührt. Die Abspaltung der einzelnen Schutzgruppen konnte über HPLC-Kontrolle bei 85 %, 65 % und 45 % Methanol verfolgt werden.

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der braune Rückstand 2 x mit 100 ml Chloroform ausgeschüttelt, mit 200 ml Wasser versetzt und kräftig geschüttelt. Der dabei ausfallende Niederschlag wurde abfiltriert und über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> getrocknet.

Ausbeute: 9,1 g    (28,5 mMol,    74 % d. Th.)

MG: C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - 318,25 g

UV: λ<sub>max</sub> = 281, 274, 266, 246-252 nm,    ε = 5.130, 6.170, 5.750, 5.130 <sup>69)</sup>

HPLC: t<sub>R</sub> = 3,25 Min    (45 % MeOH)

<sup>1</sup>H-NMR: siehe Tabelle 6 (in D<sub>2</sub>O)

FAB-MS: positive mode

m/z = 319 : 50 % (M+H)<sup>+</sup>

negative mode

m/z = 409 : 48 % (M-H+Gly)<sup>-</sup>

m/z = 317 : 75 % (M-H)<sup>-</sup>

#### 8.15.     **Synthese von 2-CF<sub>3</sub>- Benzimidazolribosid -3',5'- cyclophosphat (9)**

0,16 g (0,5 mMol) trockenes 2-CF<sub>3</sub>-Benzimidazolribosid (23) wurden in 3 ml Trimethylphosphat gelöst, mit 100 µl POCl<sub>3</sub> und 40 µl Pyridin versetzt und unter Eiskühlung 3 Std. gerührt. Die Reaktion wurde über HPLC (18 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer) verfolgt, indem man 10 µl der Reaktionslösung mit 200 µl H<sub>2</sub>O hydrolisierte.

Nach Beendigung der Reaktion tropfte man den Reaktionsansatz in eine Lösung aus 6 ml 1 N KOH, 36 ml CH<sub>3</sub>CN und 18 ml H<sub>2</sub>O und neutralisierte mit 6 N HCl. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mehrmals in Toluol und anschließend Methanol aufgenommen und wieder einrotiert, um das Pyridin zu entfernen. Der Rückstand wurde 2 x mit Ether ausgeschüttelt, in 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und lyophilisiert.

Die Trennung erfolgte über Flash-Chromatographie mit 10 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer. Das Produkt eluierte mit Fraktion 6 und wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 70 mg (0,185 mMol, 37 % d. Th.)

MG: C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>P - 380,2 g

HPLC: t<sub>R</sub> = 8,56 Min (18 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer)

UV: λ<sub>max</sub> = 281, 274, 266, 246-252 nm. ε = 5.130, 6.170, 5.750, 5.130 <sup>69)</sup>

<sup>31</sup>P-NMR: Singulett bei - 0,27 ppm (in DMSO-d<sub>6</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR: siehe Tabelle 6 (in DMSO-d<sub>6</sub>)

FAB-MS: positive mode

m/z = 381 : 20 % (M+H)<sup>+</sup>

m/z = 187 : 40 % (B+H)<sup>+</sup>

negative mode

m/z = 379 : 84 % (M-H)<sup>-</sup>

m/z = 185 : 95 % (B-H)<sup>-</sup>

#### 8.16.     **Synthese von (Rp)- und (Sp)-8-Chlorguanosin-3',5'-cyclo-thiophosphat (12), (13)**

0.108 g (0,3 mMol) getrocknetes 8-Bromguanosin (14) wurden in 6 ml Triethylphosphat durch leichtes Erwärmen gelöst. Zu der Lösung gab man insgesamt 66 µl (0,66 mMol) Thiophosphorylchlorid, wobei sich die Zugabe über 3 Std. verteilte. Die Lösung wurde 20 Std. bei RT ge-

rührt und die Reaktion über HPLC verfolgt (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer), für die 10 µl der Reaktionslösung mit 200 µl H<sub>2</sub>O hydrolisiert wurden.

Nach Beendigung der Reaktion tropfte man den Reaktionsansatz in eine unter Rückfluß siedende Lösung aus 3,6 ml 1 N KOH, 21,6 ml CH<sub>3</sub>CN und 10,8 ml H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Lösung im Eisbad abgekühlt, mit 6 N HCl neutralisiert, am Rotationsverdampfer eingengt, 2 x mit Ether ausgeschüttelt, mit 20 ml H<sub>2</sub>O versetzt und lyophilisiert.

Die Trennung erfolgte über Flash-Chromatographie mit 20 % MeOH/100 mM TEAF-Puffer als Laufmittel. Die Produkte eluierten mit Fraktion 11 und 13 und wurden lyophilisiert.

Ausbeute (Sp)-8-Cl-cGMPS : 8,2 mg (21 µMol, 7 % d. Th.)

(Rp)-8-Cl-cGMPS: 14,2 mg (36 µMol, 12 % d. Th.)

MG: C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>6</sub>PS - 395,7 g

UV: λ<sub>max</sub> = 258 nm, ε = 15.500 (bei pH 1) <sup>53)</sup>

HPLC: t<sub>R</sub> (Sp)-8-Cl-cGMPS = 13,42 Min (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer)

t<sub>R</sub> (Rp)-8-Cl-cGMPS = 25,15 Min (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer)

<sup>31</sup>P-NMR (Sp)-8-Cl-cGMPS : Singulett bei 51,4 ppm (DMSO-d<sub>6</sub>)

(Rp)-8-Cl-cGMPS : Singulett bei 53,8 ppm (DMSO-d<sub>6</sub>)

FAB-MS: positive mode

m/z = 396 : 70 % (M+H)<sup>+</sup>

m/z = 362 : 18 % (M-Cl+H)<sup>+</sup>

negative mode

m/z = 394 : 48 % (M-H)<sup>-</sup>

m/z = 360 : 20 % (M-Cl-H)<sup>-</sup>

m/z = 184 : 20 % (B-H)<sup>-</sup>

m/z = 150 : 10 % (B-Cl-H)<sup>-</sup>

**8.17.      Synthese von 8-Aminoguanosin (29) <sup>57)</sup>**

1,08 g (3 mMol) 8-Bromguanosin (14) wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O suspendiert und unter Rückfluß erhitzt. Zu der Lösung gab man 2 ml 60 % Hydrazin-Lsg. und ließ 6 Std. weiterrühren. Die Reaktionslösung wurde lyophilisiert und der Rückstand direkt eingesetzt.

Ausbeute: 0,87 g    (2,9 mMol,    97 % d. Th.)

MG: C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> - 298,1 g

UV:  $\lambda_{\max}$  = 257 nm     $\epsilon$  = 13.900 <sup>57)</sup>

HPLC:  $t_R$  = 2,30 Min    (7,5 % CH<sub>3</sub>CN/100 mM TEAF-Puffer)

FAB-MS: positive mode

$m/z$  = 299 : 30 % (M+H)<sup>+</sup>

negative mode

$m/z$  = 297 : 50 % (M-H)<sup>-</sup>

Tabelle 6 : Chemische Verschiebung  $\delta$  (ppm) und Kopplungskonstanten J (Hz)

|          | Verbindung       |                  |                 |                  |
|----------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
|          | 8-Br-cGMP<br>(2) | 8-Cl-cGMP<br>(3) | 8-I-cGMP<br>(4) | 6-SH-cGMP<br>(5) |
| $\delta$ |                  |                  |                 |                  |
| 1'       | 5,97 d           | 5,67 s           | 5,52 s          | 5,85 s           |
| 2'       | 4,97 d           | 4,75 d           | 4,70 d          | 4,74 d           |
| 3'       | 5,27 ddd         | 5,09 ddd         | 4,98 ddd        | 4,91 ddd         |
| 4'       | 4,17 ddd         | 3,85 ddd         | 3,92 ddd        | 4,16 ddd         |
| 5'       | 4,45 ddd         | 4,10 ddd         | 4,11 ddd        | 4,43 ddd         |
| 5''      | 4,25 ddd         | 3,95 ddd         | 4,03 ddd        | 4,24 ddd         |
| 1        |                  |                  | 8,35 s          | 8,40 s           |
| 2        | 6,82 s           | 6,82 s           | 6,84 s          |                  |
| 4        |                  |                  |                 |                  |
| 5        |                  |                  |                 |                  |
| 6        |                  |                  |                 |                  |
| 7        |                  |                  |                 |                  |
| 8        |                  |                  |                 | 7,94 s           |
| J-H, H   |                  |                  |                 |                  |
| 1' 2'    | 0,5              |                  |                 |                  |
| 2' 3'    | 5,75             | 4,3              | 6,0             | 5,25             |
| 3' 4'    | 9,75             | 8,3              | 9,6             | 9,75             |
| 4' 5'    | 4,25             | 4,7              | 5,4             | 4,5              |
| 4' 5''   | 10,2             | 9,4              | 10,0            | 10,2             |
| 5' 5''   | 9,75             | 8,8              | 9,7             | 9,25             |
| J-H, P   |                  |                  |                 |                  |
| 3' P     | 2,25             | 2,8              | 2,4             | 2,2              |
| 5' P     | 21,5             | 20,8             | 21,6            | 21,5             |
| 5'' P    | 2,0              | 2,1              | 2,4             | 1,75             |

| cIMP<br>(6) | 2-NH <sub>2</sub> -cPuMP<br>(7) | cPuMP<br>(8) | 2-CF <sub>3</sub> -cBiMP<br>(9) | 2-CF <sub>3</sub> -BiR<br>(23) |
|-------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 6,11 s      | 5,85 s                          | 6,3 s        | 5,99 s                          | 5,84 d                         |
| 4,71 d      | 4,50 d                          | 4,54 d       | 4,36 d                          | 4,5 dd                         |
| 4,84 ddd    | 4,56 ddd                        | 4,95 ddd     | 4,49 ddd                        | 4,16 dd                        |
| 4,27 ddd    | 3,94 ddd                        | 3,30 ddd     | 4,02 ddd                        | 4,0 dt                         |
| 4,52 ddd    | 4,15 ddd                        | 4,13 ddd     | 4,27 ddd                        | 4,75 m                         |
| 4,46 ddd    | 4,06 ddd                        | 3,68 ddd     | 4,21 ddd                        | 4,75 m                         |
| 8,18 s      |                                 |              |                                 |                                |
| 8,14 s      | 6,66 s                          |              |                                 |                                |
|             |                                 |              | 7,62 d                          | 7,87 m                         |
|             |                                 |              | 7,53 dt                         | 7,43 m                         |
|             | 8,6 s                           | 8,97 s       | 7,46 dt                         | 7,43 m                         |
|             |                                 |              | 7,89 d                          | 8,23 m                         |
| 8,14 s      | 8,2 s                           | 8,62 s       |                                 |                                |
|             |                                 |              |                                 | 7,5                            |
| 5,1         | 5,0                             | 5,4          | 6,0                             | 5,7                            |
| 9,6         | 10,2                            | 12,3         | 9,9                             | 2,4                            |
| 4,5         | 5,4                             | 5,1          | 4,2                             | 3,2                            |
| 10,5        | 10,3                            | 14,2         | 10,2                            | 3,2                            |
| 9,2         | 9,25                            | 10,5         | 9,0                             | 12,3                           |
|             |                                 |              |                                 |                                |
| 1,5         | 2,3                             | 1,7          | 2,4                             |                                |
| 21,3        | 20,0                            | 21,8         | 24,0                            |                                |
| 2,4         | 2,5                             | 2,4          | 2,7                             |                                |

## 9. ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 9.1. Enzyme und Materialien

Cyclophosphodiesterase aus Rinderherz (E.C. 3.1.4.1.) stammte von Sigma Chemie. Die cGMP-abhängige Proteinkinase wurde nach der Methode von Walter et al.<sup>119)</sup> isoliert und gereinigt.

<sup>32</sup>P-ATP wurde von Amersham Corp. bezogen. Kemptide war von Peninsula. Centricon 10 Membranfilter stammten von Amcon, Witten, FRG. P81 Ionenaustauscherpapier war von Whatman.

Alle anderen benötigten Reagenzien waren in den Arbeitsgruppen vorhanden.

Die Radioaktivität wurde mit einem Packard 1900 CA Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer gemessen. Zentrifugiert wurde mit einer Sorvall RC 5.

### 9.2. Cyclophosphodiesterase - Assay

0,1 µMol Cyclonucleotid wurden in 900 µl 25 mM Tris/HCl - Puffer (pH 7,5), der 1 mM an MgCl<sub>2</sub> war, gelöst und mit 100 µl Enzymlösung (0,1 U) versetzt. Die Reaktionstemperatur betrug 30° C.

In regelmäßigen Zeitabständen wurden 50 µl Proben entnommen und 1 Minute in siedendem Wasser abgekocht, um das Enzym zu deaktivieren.

Die Hydrolyse wurde über HPLC-Messungen verfolgt und die Abbauraten durch graphische Auswertung der Hydrolysedaten bestimmt. Alle Versuche wurden ein- oder zweimal wiederholt.

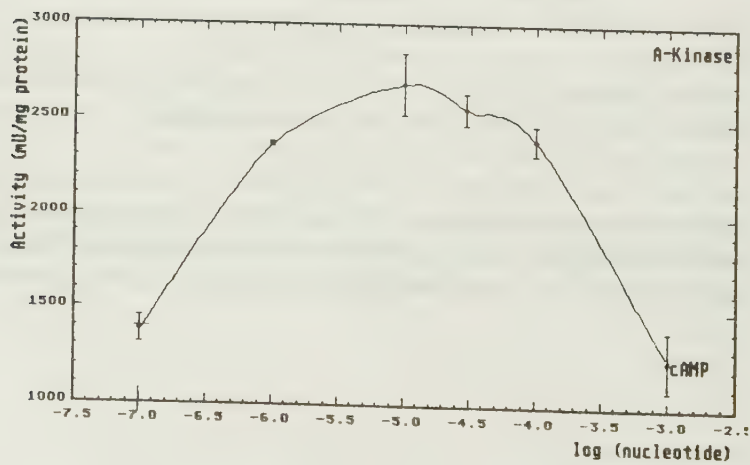
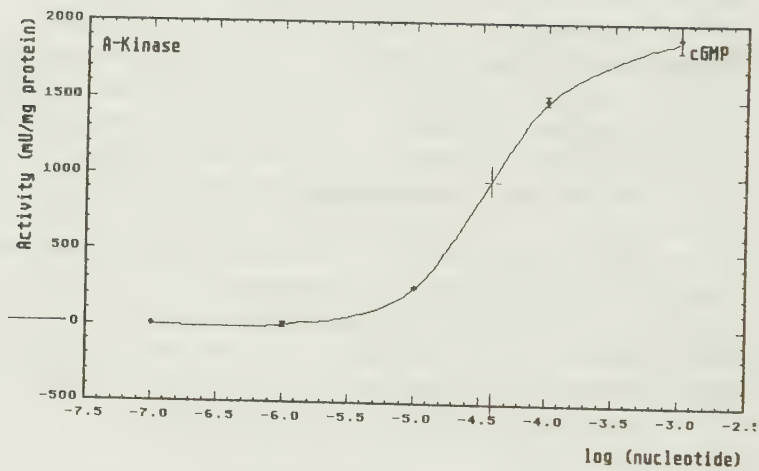
### 9.3. cGMP-abhängiger Proteinkinase - Assay <sup>110)</sup>

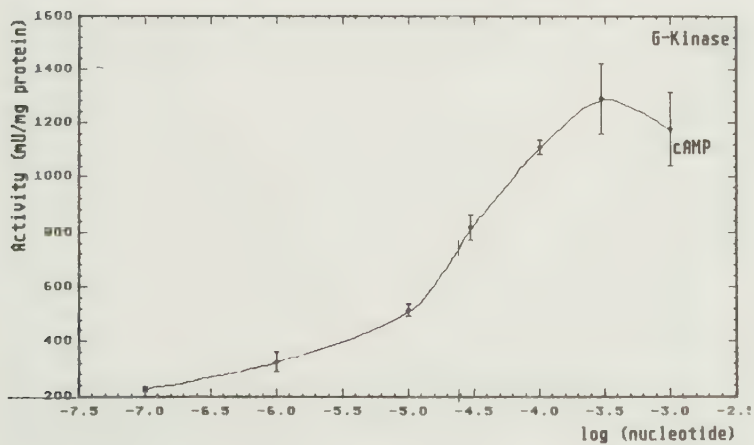
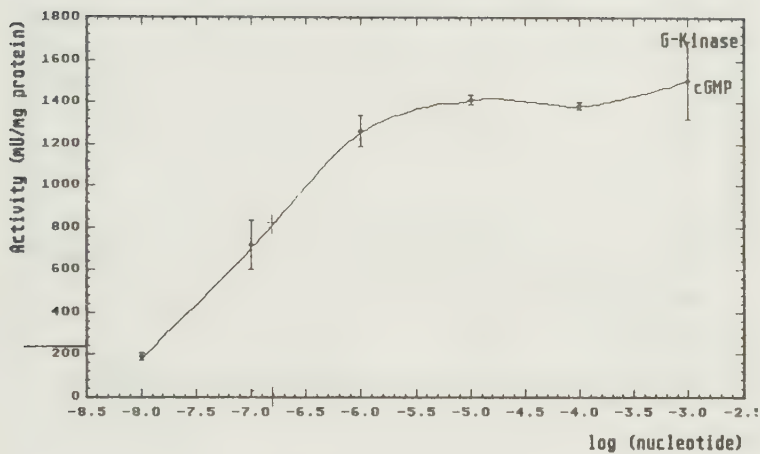
|         |                                                               | <u>Endkonzentration</u> |
|---------|---------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 10 µl   | 0,2 M Tris/HCl-Puffer (pH 7,4)                                | 20 mM                   |
| 10 µl   | 0,1 M MgCl <sub>2</sub>                                       | 10 mM                   |
| 10 µl   | 50 mM 2-Mercaptoethanol                                       | 5 mM                    |
| 10 µl   | 0,1 % BSA                                                     | 0,01 %                  |
| 10 µl   | Kemptide 1 mg/ml                                              | 10 µg (130 µM)          |
| 10 µl   | cG-Kinase                                                     | 50 ng                   |
| 10 µl   | Derivat in der entsprechenden Verdünnung                      |                         |
| 10 µl   | H <sub>2</sub> O                                              |                         |
| <hr/>   |                                                               |                         |
| 80 µl   | 5 Minuten bei 30° C vorinkubieren                             |                         |
| + 20 µl | 250 µM $\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (etwa 100 cpm/pmol)     |                         |
| <hr/>   |                                                               |                         |
| 100 µl  | 5 Min bei 30° C inkubieren                                    |                         |
| + 50 µl | stoppen mit 0,3 M EDTA -Lsg. (pH 7,0)                         |                         |
| <hr/>   |                                                               |                         |
| 150 µl  | 30 µl davon auf P-81 Papier geben                             |                         |
|         | 3 mal 15 Min mit 75 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> waschen |                         |
|         | 30 Min bei 80° C trocknen                                     |                         |
|         | in (nicht-wäßriger) Szintillatorflüssigkeit zählen            |                         |

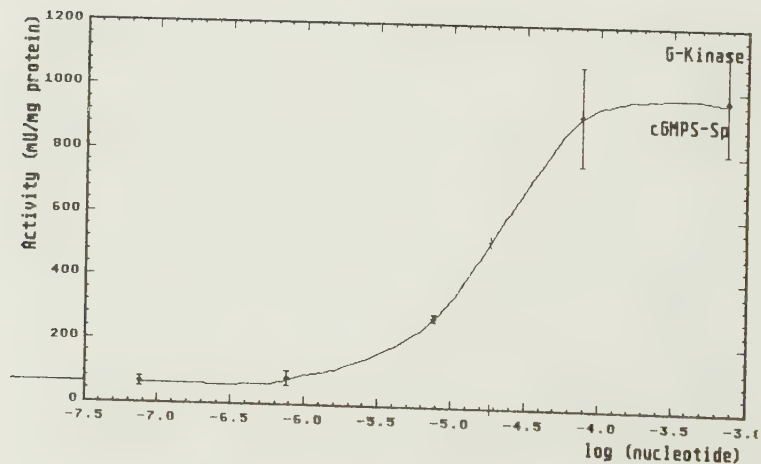
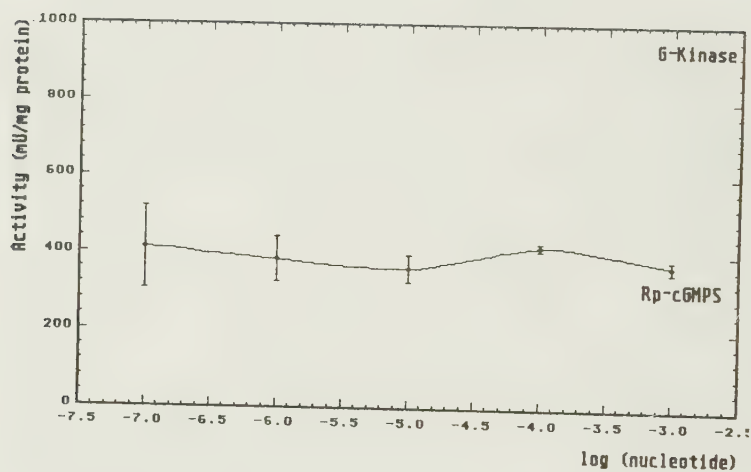
Alle Messungen wurden zweimal mit je drei gleichen Derivatkonzentrationen zwischen 10<sup>-3</sup>M und 10<sup>-7</sup>M durchgeführt.

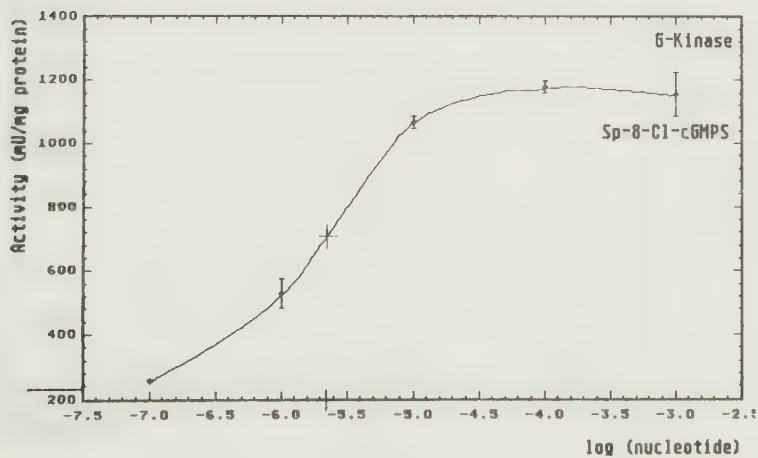
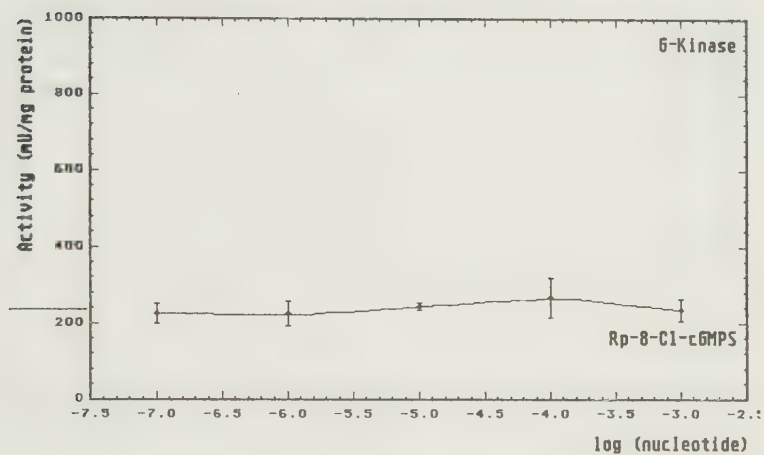
Für die Versuche mit (Rp)-cGMPS (10) wurde 1 µMol Derivat in 100 µl cPDE-Enzymlösung (siehe cPDE-Assay oben) gelöst und 30 Minuten bei 30° C inkubiert. Die Cyclophosphodiesterase und andere Verunreinigungen wurden über einen Membranfilter (10 kD) bei 6000 x g abgetrennt.

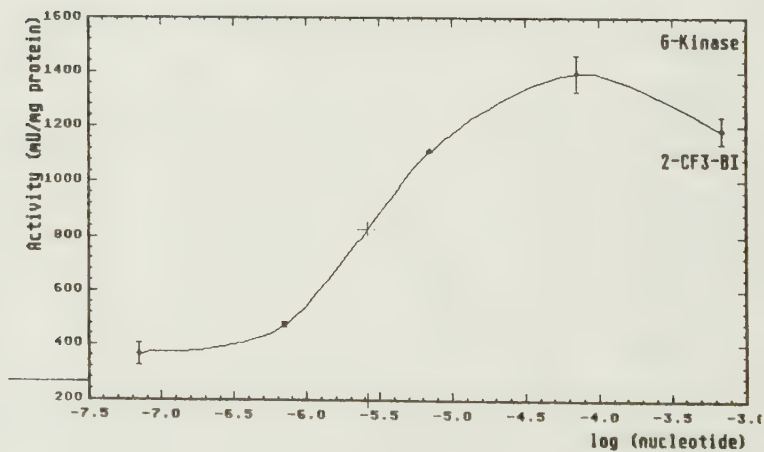
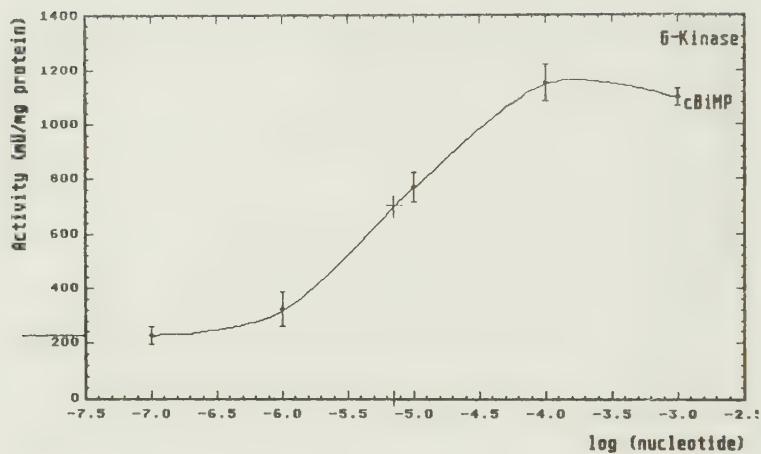
### 9.3.1. Aktivierungskurven

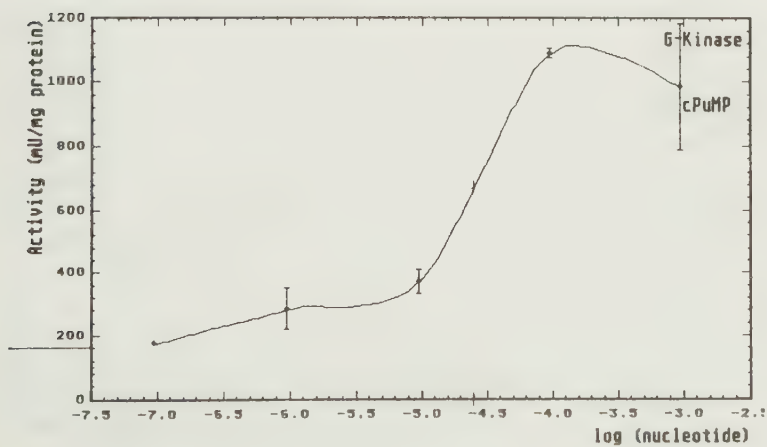
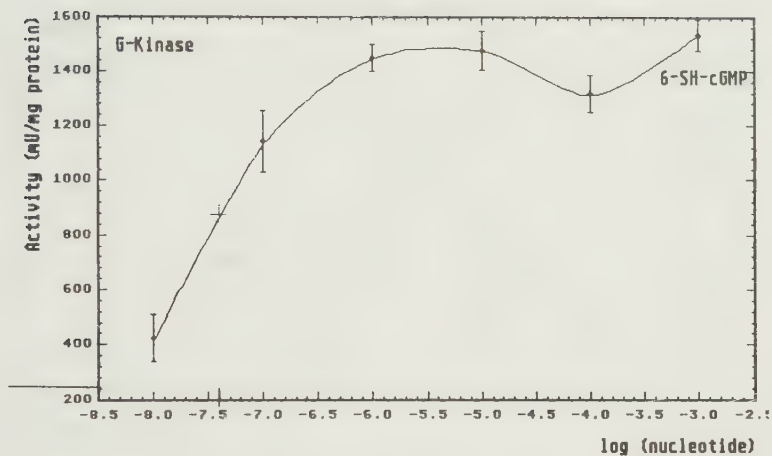


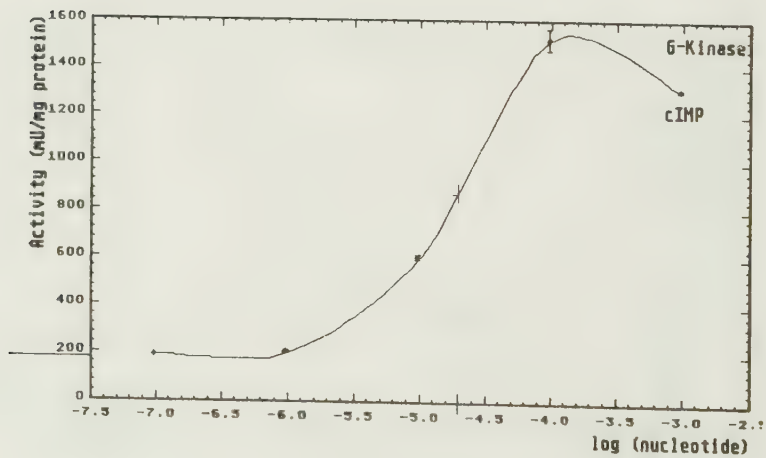
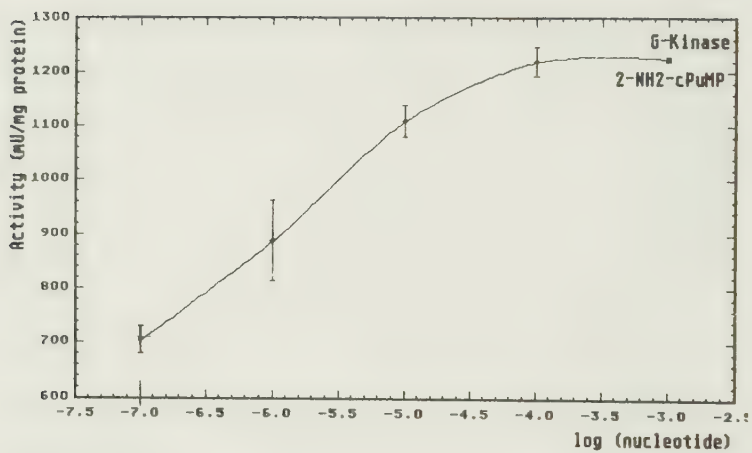


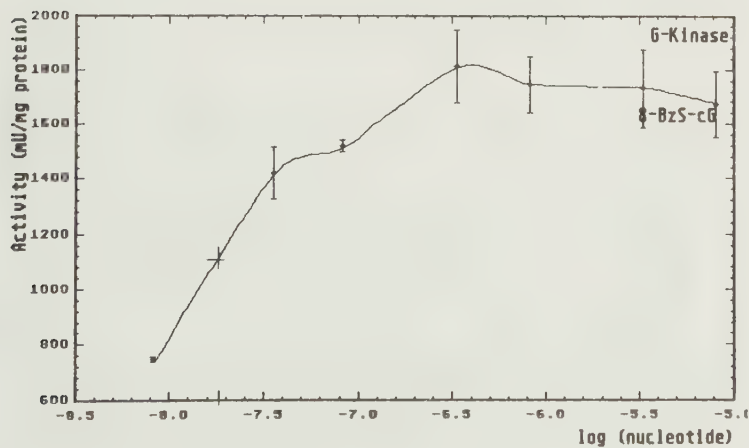
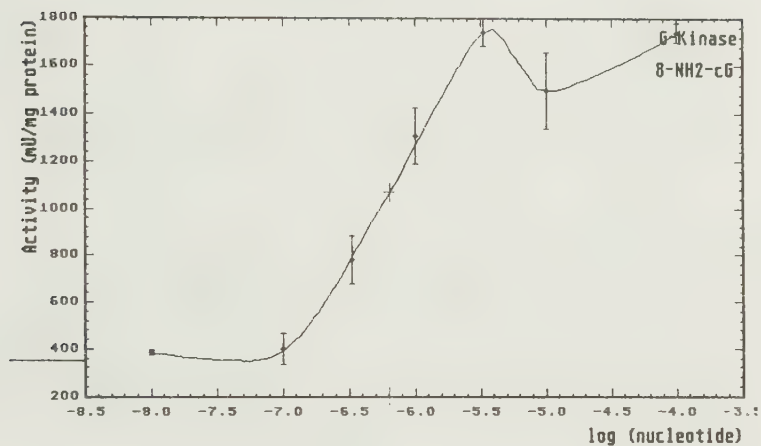


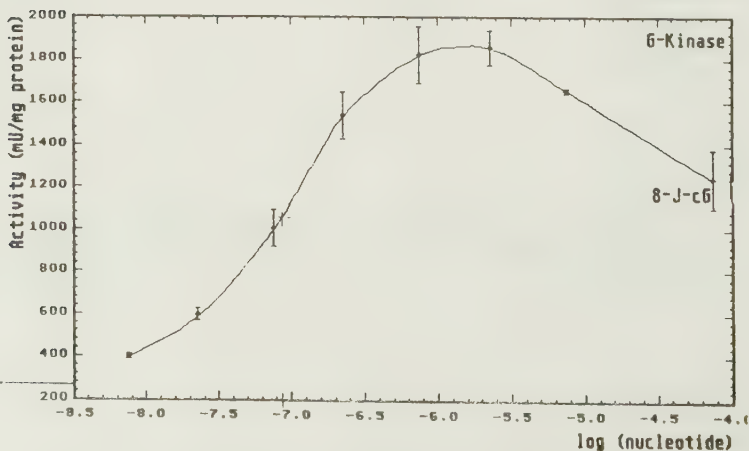
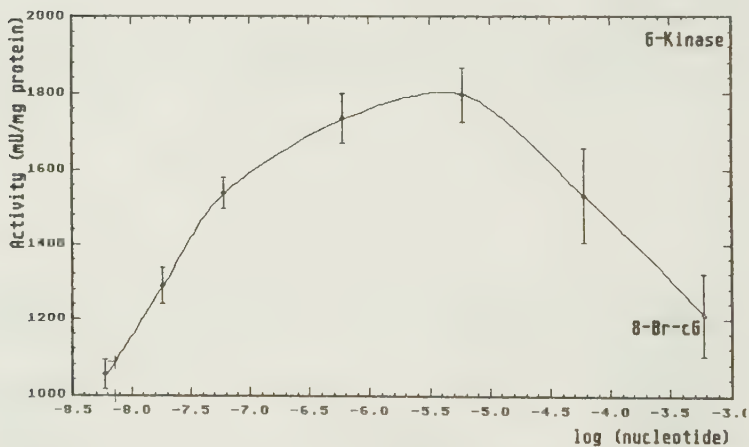
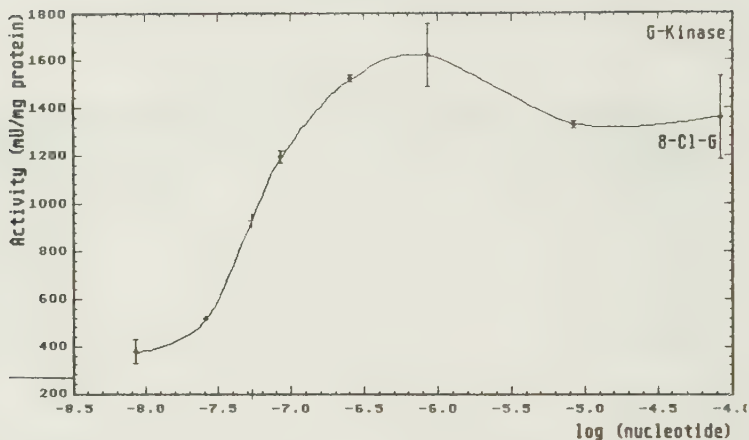












## 10. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) D.F. Ashman, R. Lipton, M.M. Melicow, T.D. Price  
Isolation of cAMP and cGMP from rat urine  
Biochem. Biophys. Res. Commun., **11**, 330-334, (1963)
- 2) N.D. Goldberg, M.K. Haddox  
Cyclic GMP Metabolism and Involvement in Biological Regulation  
Ann. Rev. Biochem., **46**, 823-896, (1977)
- 3) U. Walter  
Cyclic-GMP-Regulated Enzymes and Their Possible Physiological Functions  
Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research, **17**, 249-258, (1984)
- 4) C.-L. Huang, H.E. Ives, M.G. Cogan  
In vivo evidence that cGMP is the second messenger for atrial natriuretic factor  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 8015-8018, (1986)
- 5) M. Cantin, J. Genest  
Das Herz als endokrine Drüse  
Spektrum der Wissenschaft, **4**, 122-128, (1986)
- 6) N.C. Trippodo, F.E. Cole, A.A. Macphree., B.L. Pergram  
Biologic mechanisms of atrial natriuretic factor  
J. Lab. Clin. Med., **109**(2), 112-119, (1987)
- 7) T. Laasberg, A. Pihlak, T. Neuman, H. Pavers, M. Saarma  
Nerve growth factor increase the cyclic GMP level and activates the cyclic GMP phosphodiesterase in PC 12 cells  
FEBS Lett., **239**(2), 367-370, (1988)
- 8) W.J. George, J.B. Polson, A.G. O'Toole, N.D. Goldberg  
Elevation of Guanosine 3',5'-Cyclic Phosphate in Rat Heart after Perfusion with Acetylcholine  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **66**, 398-403, (1970)

- 9) K.I. Furukawa, Y. Tawada, M. Shigekawa  
Regulation of the Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  Pump by Cyclic Nucleotides in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells  
J. Biol. Chem., **263**(17), 8058-8065, (1988)
- 10) K. Baltensperger, E. Carafoli, M. Chiesi  
The  $\text{Ca}^{2+}$  - pumping ATPase and the major substrates of the cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle sarcolemma are distinct entities  
Eur. J. Biochem., **172**, 7-16, (1988)
- 11) T. Cornwell, T.M. Lincoln  
Regulation of Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Levels in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells  
J. Biol. Chem., **264**(2), 1146-1155, (1989)
- 12) L. Stryer  
Cyclic GMP Cascade of Vision  
Ann. Rev. Neurosci., **9**, 87-119, (1986)
- 13) M. Chabre, P. Deterre  
Molecular mechanism of visual transduction  
Eur. J. Biochem., **179**, 255-266, (1989)
- 14) H. Kimura, F. Murad  
Two Forms of Guanylate Cyclase in Mammalian Tissues and possible Mechanisms for their Regulation  
Metabolism, **24**, 439-445, (1975)
- 15) M.M. Appleman, M.A. Ariano, D.J. Takemoto, R.H. Whitson  
Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases  
Cyclic Nucleotides, Vol. I, Springer-Verlag, edited by S.W. Kebabian, J.A. Nathansen, 261-300, (1982)
- 16) Franz Hofmann  
Signal-Aufnahme und Signal-Umsetzung in der Zelle  
Chemie in unserer Zeit, **21**(6), 186-193, (1987)

- 17) U. Kaupp, K.-W. Koch  
Mechanism of photoreception in vertebrate vision  
TIBS, **11**, 43-47, (1986)
- 18) L. Stryer  
Die Sehkaskade  
Spektrum der Wissenschaft, **9**, 86-95, (1987)
- 19) J.K. Kuo, P. Greengard  
Cyclic Nucleotide-dependent Protein Kinases  
J. Biol. Chem., **252**, 2493-2497, (1970)
- 20) T.M. Lincoln, J.D. Corbin  
Adv. Cyclic Nucleotide Res., **15**, 139-192, (1983)
- 21) H.R. de Jonge  
Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase in Intestinal Brushborders  
Adv. Cyclic Nucleotide Res., **14**, 315-333, (1981)
- 22) L. Wolfe, S.H. Francis, J.D. Corbin  
Properties of a cGMP-dependent Monomeric Protein Kinase from Bovine Aorta  
J. Biol. Chem., **264**(7), 4157-4162, (1989)
- 23) K. Takio, R.D. Wade, S.B. Smith, E.G. Krebs, K.A. Walsh, K. Titani  
Guanosine Cyclic 3',5'-Phosphate Dependent Protein Kinase, a Chimeric Protein Homologous with Two Separate Protein Families  
Biochem., **23**, 4207-4218, (1984)
- 24) The Enzymes  
Vol. XVII, Academic Press Inc., Third Edition, edited by P.D. Boyer, E.G. Krebs, 43- 111, (1986)
- 25) S.O. Døskeland, D. Øgreid, J.P. Miller  
Evidence that Cyclic Nucleotides Activating Rabbit Muscle Protein Kinase I Interact with Both Types of cAMP Binding Sites Associated with the Enzyme  
J. Biol. Chem., **258**, 1041-1049, (1983)

- 26) S.O. Døskeland, O.K. Vintermyr, J.D. Corbin, D. Øgreid  
Studies on the Interactions between the Cyclic Nucleotide-binding Sites of cGMP-dependent Protein Kinase  
J. Biol. Chem., **262**(8), 3534-3540, (1987)
- 27) F. Hofmann, V. Flockerzi  
Characterization of Phosphorylated and Native cGMP-dependent Protein Kinase  
Eur. J. Biochem., **130**, 599-603, (1983)
- 28) J.P. Miller  
Cyclic AMP Derivatives as Tools for Mapping Cyclic AMP Binding Sites of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase  
Adv. Cyclic Nucleotide Res., **14**, 335-344, (1981)
- 29) R.J.W. de Witt, J. Hoppe, W.J. Stec, J. Baraniak, B. Jastorff  
Interaction of cAMP Derivatives with the Stable cAMP-Binding Site in the cAMP-Dependent Protein Kinase Type I  
Eur. J. Biochem., **122**, 95-99, (1982)
- 30) D. Øgreid, R. Ekanger, R.H. Suva, J.P. Miller., S.O. Døskeland  
Comparison of the two classes of binding sites (A and B) of type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinase by using cyclic nucleotides analogs  
Eur. J. Biochem., **181**, 19-31, (1989)
- 31) B. Jastorff, J. Hoppe, M. Morr  
A Model for the Chemical Interactions of Adenosine 3',5'-Monophosphate with the R Subunit of Protein Kinase Type I  
Eur. J. Biochem., **101**, 555-561, (1971)
- 32) J.D. Rothermel, W.J. Stec, J. Baraniak, B. Jastorff, L.H. Botelho  
Inhibition of Glycogenolysis in Isolated Rat Hepatocytes by the Rp Diastereomer of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphorothioate  
J. Biol. Chem., **258**(20), 12125-12128, (1983)

- 33) M.E. Pereira, D. L. Segaloff, M. Ascoli, F. Eckstein  
Inhibition of Choriogonadotropin-activated Stereoidogenesis in  
Cultured Leydig Tumor Cells by the Rp Diastereomer of Adenosine  
3',5'-Cyclic Phosphorothioate  
J. Biol. Chem., **262**(13), 6093-6100, (1987)
- 34) I.T. Weber, T.A. Steitz, J. Bubis, S.S. Taylor  
Predicted Structures of cAMP Binding Domains of Type I and II  
Regulatory Subunits of cAMP-dependent Protein Kinase  
Biochem., **26**, 343-351, (1987)
- 35) W. Dostmann, R. Störmann, B. Jastorff  
Cyclic AMP Binding Sites in Cyclic AMP Dependent Kinases:  
The Rationale of Molecular Interactions between a Cyclic Nucleo-  
tides and its Receptor Sites A and B  
Eur. J. Biochem., zur Veröffentlichung eingereicht
- 36) J.D. Corbin, D. Øgreid, J.P. Miller, R.H. Suva, B. Jastorff, S.O.  
Døskeland  
Studies of cGMP Analog Specificity and Function of the Two  
Intrasubunit Binding Sites of cGMP-dependent Protein Kinase  
J. Biol. Chem., **261**(3), 1208-1214, (1986)
- 37) B. Jastorff  
The Effects of Cyclic Nucleotide Derivatives on Cell Metabolism  
Cell regulation by Intracellular Signals, edited by S. Swillens, J.E.  
Dumont, Plenum Publishing Corporation, 195-207, (1982)
- 38) W.-D. Stohrer, B. Jastorff,  
unveröffentlichte Ergebnisse
- 39) J.D. Rothermel, L.H. Parker Botelho  
A mechanistic and kinetic analysis of the interactions of the  
diastereomers of adenosine 3',5'-(cyclic)Phosphorothioate with  
purified cyclic AMP-dependent protein kinase  
Biochem. J., **251**, 757-762, (1988)

- 40) L.H. Parker Botelho, L.C. Webster, J.D. Rothermel, J. Baraniak, W.J. Stec  
Inhibition of cAMP-dependent Protein Kinase by Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphorodithioate, a Second cAMP Antagonist  
J. Biol. Chem., **263**(11), 5301-5305, (1988)
- 41) E. Butt  
Neuer Syntheseweg für die Darstellung ausgewählter Derivate des Guanosin-3',5'-cyclophosphats, chemische und biologische Eigenschaften  
Diplomarbeit, Universität Bremen, (1987)
- 42) H.G. Genieser, E. Butt, U. Bottin, W. Dostmann, B. Jastorff  
Synthesis of 3',5'-Cyclic Phosphates from Unprotected Nucleosides  
Synthesis, **1**, 53-54, (1988)
- 43) H.G. Genieser, W. Dostmann, U. Bottin, E. Butt, B. Jastorff  
Synthesis of Nucleoside-3',5'-Cyclic Phosphorothioates by Cyclo-thiophosphorylation of Unprotected Nucleosides  
Tetrahedron Lett., **29**(23), 2803-2804, (1988)
- 44) M. Smith, G.I. Drummond, H.G. Khorana  
Ribonucleoside 3',5'-Cyclic Phosphates. A General Method of Synthesis and some Properties  
J. Am. Chem. Soc., **83**, 698-706, (1961)
- 45) R.K. Borden, M. Smith  
Preparation of Nucleoside-3',5'-Cyclic Phosphates in Strong Base  
J. Org. Chem., **31**, 3247-3253, (1966)
- 46) F. Eckstein, L.P. Simonson, H.-P. Bär  
Adenosine 3',5'-Cyclic Phosphorothioate: Synthesis and Biological Properties  
Biochem., **13**(18), 3806-3810, (1974)
- 47) F. Eckstein, U. Kutzke  
Synthesis of Nucleoside 3',5'-Cyclic Phosphorothioates  
Tetrahedron Lett., **27**(15), 1657-1660, (1986)

- 48) J. Baraniak, R.W. Kinas, K. Lesiak, W.J. Stec  
Stereospecific Synthesis of Adenosine 3',5'-(Sp)- and (Rp)-Cyclic  
Phosphorothioates (cAMPS)  
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 941-942, (1979)
- 49) J. Baraniak, W.J. Stec  
Ribonucleoside Cyclic 3',5'-Phosphoramidates: Synthesis, Stereo-  
chemistry and Conversion into Ribonucleoside Cyclic 3',5'-  
Phosphorothioates and -(<sup>18</sup>O) Phosphates  
J. Chem. Soc. Perkin Trans.I, 1645-1656, (1987)
- 50) E. de Vroom, G.A. van der Marel, J.H. Boom  
Synthesis of ribonucleoside 3',5'-cyclic phosphorothioates using  
a modified hydroxybenzotriazole phosphotriester approach  
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, **106**(11), 577-580, (1987)
- 51) H.J. Brenntnall, D.W. Hutchinson  
Preparation of 8-Chloroadenosine and its Phosphate Esters  
Tetrahedron Lett., **25**, 2595-2596, (1972)
- 52) K. Muneyama, D.A. Shuman, K.H. Boswell, R.K. Robins, L.N.  
Simon, J.P. Miller  
Synthesis and Biological Activity of 8-Haloadenosine 3',5'-Cyclic  
Phosphates  
J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides, **1**(1), 55-60, (1974)
- 53) E.K. Ryu, M. MacCos  
New Procedure for the Chlorination of Pyrimidine and Purine  
Nucleosides  
J. Org. Chem., **46**, 2819-2823, (1981)
- 54) H. Hayakawa, H. Tanaka, K. Haraguchi, M. Mayumi, M. Nakajima,  
T. Sakamaki, T. Miyasaka  
Preparation of 8-chloropurine nucleosides through the reaction  
between their C-8 lithiated species and toluene sulfonyl chloride  
Nucleosides, Nucleotides, **7**(1), 121-128, (1988)

- 55) H.G. Genieser  
persönliche Mitteilung, Universität Bremen
- 56) R.E. Holmes, R.K. Robbins  
Direct Bromination of Adenosine, Desoxyadenosine, Guanosine  
and Related Purine Nucleosides  
J. Am. Chem. Soc., **86**, 1242-1245, (1964)
- 57) O. Michael, M. Mühlegger, O. Nelboeck, G. Weimann  
Cyclophosphates as Substrates and Effectors of Phosphodiesterase  
Pharm. Res. Commun., **6**(3), 203-252, (1974)
- 58) D. Lipkin, F.B. Howard, D. Nowotny, M. Sano  
The Iodination of Nucleosides and Nucleotides  
J. Biol. Chem., **238**, PC 2249, (1963)
- 59) J.F. Gerster, A.F. Lewis, R.K. Robins  
The Synthesis of 6-Halogenated 9- $\beta$ -D-Ribofuranosylpurines  
from Inosine and Guanosine  
J. Org. Chem., **28**, 945-948, (1963)
- 60) Procedures in Nucleic Acid Chemistry  
Vol I, Pergamon Press, edited by W.W. Zorbach, R.S. Tipson,  
244-245, (1968)
- 61) J.J. Fox, I. Wempen, A. Hampton, I.L. Doerr  
Synthesis of Thioguanosine and Related Purine Nucleosides  
J. Am. Chem. Soc., **80**, 1669-1675, (1958)
- 62) M.A. Phillips  
Synthesis of 2-Trifluoromethyl-benzimidazole  
J. Chem. Soc., 2395-2397, (1928)
- 63) I.W. Southon, W. Pfeleiderer  
Synthese und Eigenschaften von Benzimidazolnucleosiden  
Chem. Ber., **111**, 996-1005, (1978)

- 64) H. Vorbrüggen, K. Krolikiewicz, B. Bennua  
Nucleoside Synthesis with Trimethylsilyl Triflate and Perchlorate  
as Catalysts  
Chem. Ber., **114**, 1234-1255, (1981)
- 65) G. Holan, E.L. Samuel, B.C. Ennis, R.W. Hinde  
2-Trihalogenomethylbenzazoles, Part I. Formation  
J. Chem. Soc. 20-25, (1967)
- 66) D.E. Burton, A.J. Lambie, G.T. Newbold, A. Percival, D.T. Saggars  
2-Trifluormethylbenzimidazole: A new Class of Herbicidal  
Compounds  
Nature, **208**, 1166-1169, (1965)
- 67) G.W. Adamson, D. Bawden, D.T. Saggars  
Quantitative Structure - Activity Relationship Studies of Acute  
Toxicity ( $LD_{50}$ ) in a Large Series of Herbicidal Benzimidazoles  
Pestic. Sci., **15**, 31-39, (1984)
- 68) K.H. Büchel, F. Korte  
Hemmung photosynthetischer Reaktionen durch NH-acide Imida-  
zole und Benzimidazole  
Angew. Chem., **77(20)**, 911-912, (1965)
- 69) H. Vorbrüggen, G. Höfle  
On the Mechanism of Nucleoside Synthesis  
Chem. Ber., **114**, 1196-1208, (1981)
- 70) U.Y. Mikstais, I.R. Chakste  
Catalytic role of Nucleic Acid Bases in Phosphorylation Reactions  
of Ribonucleosides with Phosphoryl Chloride  
Bioorganicheskaya Khimiya, **10**, 1207-1211, (1984)
- 71) G.C. Finger, C.W. Kruse  
Aromatic Fluorine Compounds VII: Replacement of Aromatic -Cl  
and -NO<sub>2</sub> Groups by -F  
J. Am. Chem. Soc., **78**, 6034-6037, (1956)

- 72) A.K. Barbour, C.J. Belf, W. Buxton  
The Preparation of Organic Fluorine Compounds by Halogene  
Exchange  
in: *Adv. Fluorine Chem.*, edited by M. Stacey, J.C. Tatlow, A.G.  
Sharpe, Butterworths, London, 181-270, (1963)
- 73) C.L. Liotta, H.P. Harris  
Reaction of the 18-Crown-6 Complex of Potassium Fluoride with  
Organic Substrates in Aprotic Organic Solvents  
*J. Am. Chem. Soc.*, **96**(7), 2250-2252, (1974)
- 74) Y. Kobayashi, I. Kumadaki, A. Ohsawa, S.-I. Murakami  
Synthesis of 2',3',5'-Tris-O-acetyl-8-fluoroadenosine  
*J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 430-431, (1976)
- 75) J. Ichihara, T. Matsuo, T. Hanafusa, T. Ando  
The Combination of Potassium Fluoride and Calcium Fluoride:  
A Useful Heterogeneous Fluorinating Reagent  
*J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 793-794, (1986)
- 76) W.J. Middleton  
U.S. Pat. 3, 940, 402, (1976)
- 77) W. Heilemann, R. Mews  
The Structure of Dimethylamino-Sulfurtrifluoride and some  
Aspects of Amino-Sulfur (IV)-Fluorine - Chemistry  
*J. Fluorine Chemistry*, **39**, 261-269, (1988)
- 78) B. Doboszewski, G.W. Hay, W.A. Szarek  
The rapid synthesis of deoxyfluoro sugars using tris(dimethylamino)  
sulfonium-difluorotrimethylsilicate (TASF)  
*Can. J. Chem.*, **65**, 412-419, (1987)
- 79) J. March  
Advanced Organic Chemistry  
edited by J. March, John Wiley & Sons, New York, 576-607, (1985)

- 80) M. Jovanovic  
Fluorheterocycles II. Synthesis of 3-Fluoro-1,2,4-Triazine-2-Oxides  
Heterocycles, **23(8)**, 1969-1981, (1985)
- 81) D.H. Williams, I. Fleming  
Strukturaufklärung in der org. Chemie  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 5. Aufl., 1-36, (1985)
- 82) H. Günther  
NMR-Spektroskopie  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Aufl., (1983)
- 83) M.J. Robins, M. MacCross  
Nucleic acid related compounds 26. A geometry-only method for determination the anomeric configuration of nucleosides based on the H-1' NMR signal of cyclic a and b 3',5'-mononucleosides  
J. Am. Chem. Soc., **99**, 4654-4660, (1977)
- 84) W.G. Bentrude, W.N. Setzer  
Stereospecificity in  $^{31}\text{P}$ -Element couplings: Proton - Phosphorus couplings  
in: Methodes in Stereochemical Analysis 8, edited by J.G. Verkade and L.D. Quin, VCH Florida, 365-389, (1987)
- 85) B.J. Blackburn, R.D. Lapper, I.C.P. Smith  
A Proton Magnetic Resonance Study of the Conformations of 3',5'-Cyclic Nucleotides  
J. Am. Chem. Soc., **95(9)**, 2873-2880, (1973)
- 86) F.W. Röllgen  
Fast Atom Bombardment Massenspektrometrie  
Nachr. Chem. Tech. Lab., **31**, 174-177, (1983)
- 87) C. Fenselau, R.J. Cotter  
Chemical Aspects of Fast Atom Bombardment  
Chem. Rev., **87**, 501-512, (1987)

- 88) H.-M. Schiebel, P. Schulze, W.-D. Stohrer, D. Leibfritz, B. Jastorff, K.H. Maurer  
Fast Atom Bombardment (FAB) Mass Spectrometry of Nucleoside Cyclophosphates and Structurally Related Compounds. FAB-induced Reactions before Desorption  
Biomed. Mass Spect., **12**(4), 170-180, (1985)
- 89) S.K. Sethi, C.C. Nelson, J.A. McCloskey  
Dehalogenation Reactions in Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry  
Anal. Chem., **56**, 1975-1977, (1984)
- 90) M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi  
A novel Method for Phosphorylation of Nucleosides to 5'-Nucleotides  
Tetrahedron Lett., **50**, 5065-5068, (1967)
- 91) M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi  
Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides  
Bull. Chem. Soc. Jpn., **42**, 3505-3508
- 92) K. Kikugawa, M. Ichino  
Direct Halogenation of Sugar Moiety of Nucleosides  
Tetrahedron Lett., **2**, 87-90, (1971)
- 93) M. Morr, M.-R. Kula  
Zur Reaktion von 3'-Amino-3'-desoxyadenosin mit Phosphoroxy-chlorid  
Tetrahedron Lett., **1**, 23-24, (1974)
- 94) J. Zoltewicz, D.F. Clark, T.W. Sharpless, G. Grahe  
Kinetics and Mechanism of the Acid-Catalyzed Hydrolysis of some Purine Nucleosides  
J. Am. Chem. Soc., **92**, 1714-1750, (1970)

- 95) E.R. Garrett, P.J. Metha  
Solvolysis of Adenine Nucleosides. Effects of Sugars and Adenine  
Substituents on Acid Solvolyses  
J. Am. Chem. Soc., **94**, 8532-8541, (1972)
- 96) C. Hansch, A. Leo  
Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and  
Biology  
J. Wiley & Sons, New York, (1979)
- 97) H. Kubinyi  
Quantitative Beziehungen zwischen chemischer Struktur und bio-  
logischer Aktivität  
Chemie in unserer Zeit, **20**, 191-202, (1986)
- 98) T. Braumann, B. Jastorff  
Physico-Chemical Characterization of Cyclic Nucleotides by  
Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographie  
J. Chrom., **350**, 105-118, (1985)
- 99) W. Dostmann  
Methoden zur Synthese von Adenosin-3',5'-Cyclothiophosphat  
(cAMPS) und ausgewählter Derivate: Chemische und biologische  
Eigenschaften  
Dissertation, Universität Bremen, (1987)
- 100) H. Engelhard  
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an Nucleosid-3',5'-  
monothionophosphaten. Micropräp. Trennung und Zuordnung der  
Konfiguration  
Diplomarbeit, Universität Bremen, (1984)
- 101) P.J.M. van Haastert, P.A.M. Dijkgraaf, T.M. Konijn, E.G. Abbad,  
G.P. Petridis, B. Jastorff  
Substrate Specificity of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from  
Beef Heart and from Dictyostelium discoideum  
Eur. J. Biochem. **131**, 659-666, (1983)

- 102) Cathrin Coenen  
persönliche Mitteilung, Universität Bremen
- 103) T. Braumann, C. Erneux, G. Petridis, W.-D. Stohrer, B. Jastorff  
Hydrolysis of cyclic nucleotides by a purified cGMP-stimulated phosphodiesterase: structural requirement for hydrolysis  
*Biochem. Biophys. Acta*, **871**, 199-206, (1986)
- 104) F. Kesbeke, J. Baraniak, R. Bulgakov, B. Jastorff, M. Morr, G. Petridis, W.J. Stec, F. Seela, P.J.M. van Haastert  
*Eur. J. Biochem.*, **151**, 179-186, (1985)
- 105) P.J.J.M. Ool, H.M. Buck  
The Mechanism of Action of cAMP  
*Eur. J. Biochem.*, **121**, 329-334, (1982)
- 106) W. Saenger  
Principles of Nucleic Acid Structure  
Springer, New York, (1984)
- 107) J. Moss, V. Manganiello, M. Vaughan  
Substrate and Effector Specificity of a Guanosine 3':5'-Monophosphate Phosphodiesterase from Rat Liver  
*J. Biol. Chem.*, **252(15)**, 5211-5215, (1977)
- 108) C. Erneux, D. Couchie, J.E. Dumont, J. Baraniak, W.J. Stec, E. Garcia Abbad, G. Petridis, B. Jastorff  
*Eur. J. Biochem.*, **115**, 503-510, (1981)
- 109) I.V. Sandoval, P. Cuatrecasas  
Opposing Effects of Cyclic AMP and Cyclic GMP on Protein Phosphorylation in Tubulin Preparations  
*Nature*, **262**, 511-514, (1976)

- 110) R. Roskoski  
Assays of Protein Kinase  
Methods in Enzymology, **99**, 3-6, (1983)
- 111) E. Butt  
unveröffentlichte Ergebnisse, Universität Bremen
- 112) F. Hofmann, H.-G. Gensheimer, W. Landgraf, R. Hullin, B. Jastorff  
Diastereomers of adenosine 3',5'-monothionophosphate (cAMPS)  
antagonize the activation of cGMP-dependent protein kinase  
Eur. J. Biochem., **150**, 85-88, (1985)
- 113) I.T. Weber, T.A. Steitz  
Structure of a Complex of Catabolite Gene Activator Protein and  
Cyclic AMP Refined at 2.5 Å Resolution  
J. Mol. Biol., **198**, 311-326, (1987)
- 114) J. Bubis, S.S. Taylor  
Correlation of Photolabeling with Occupancy of cAMP Binding  
sites in the Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein  
Kinase  
Biochem., **26**, 3478-3486, (1987)
- 115) J. Bubis, S.S. Taylor  
Limited Proteolysis Alters the Photoaffinity Labeling of Adenosine  
3',5'-Monophosphate Dependent Protein Kinase II with 8-Azido-  
adenosine 3',5'-Monophosphate  
Biochem., **26**, 5997-6004, (1987)
- 116) U. Walter  
persönliche Mitteilung, Universitätsklinik Würzburg
- 117) R.C. Bingham, M.J.S. Dewar, D.H. Lo  
Ground States of Molecules XXV. MINDO/3. An Improved  
Version of the MINDO Semiempirical SCF-MO Method  
J. Am. Chem. Soc., **97**(6), 1285-1293, (1975)

- 118) A. Bendich, P.J. Russel, J.J. Fox  
The Synthesis and Properties of 6-Chlorpurine and Purine  
J. Am. Chem. Soc., **76**, 6073-6077, (1954)
- 119) U. Walter, P. Miller, F. Wilson, D. Menkes, P. Greengard  
Immunological Distinction between Guanosine 3',5'- Mono-  
phate-dependent and Adenosine-3',5'-Monophosphate-dependent  
Protein Kinases  
J. Biol. Chem., **255**(8), 3757-3762, (1980)

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernd Jastorff möchte ich herzlich für die fächerübergreifende Heranführung und den Freiraum bei der Bearbeitung des Themas sowie die zahlreichen motivierenden Gespräche danken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die anregenden Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Dr. Hans-Gottfried Genieser, mit dem ich viele interessante Gespräche geführt habe.

Für die Aufnahmen der NMR-Spektren möchte ich Johannes Stelten danken. Bei Inge Erxleben und Dr. Peter Schulze bedanke ich mich für die FAB-MS-Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Mews und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Werner Heilemann und Dr. Alfred Waterfeld, danke ich für die freundliche Unterstützung bei den vielen Fluor-Experimenten.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Priv. Doz. Dr. Ulrich Walter und Dr. Susanne Lohmann sowie ihrer Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme während der biochemischen Arbeiten in Würzburg. Für die Isolierung der Kinasen und die technische Hilfe bedanke ich mich bei Lilo Fischer. Miguel van Bemmelen möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Aufstellung der endlosen Verdünnungsreihen bei den enzymatischen Versuchen danken.

## Lebenslauf

|                        |                                                                                                                                |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 25. 1. 1962            | Geboren in Osterholz-Scharmbeck als Tochter des Bankangestellten Kurt-Albert Butt und seiner Ehefrau Ilse Butt, geb. Meyerhoff |
| Aug. 1968 – Juli 1970  | Besuch der Grundschule in Heißenbüttel                                                                                         |
| Aug. 1970 – Juli 1972  | Besuch der Grundschule in Hambergen                                                                                            |
| Aug. 1972 – Juli 1974  | Besuch der Realschule in Osterholz-Scharmbeck                                                                                  |
| Aug. 1974 – Mai 1981   | Besuch des Gymnasiums in Osterholz-Scharmbeck mit dem Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife                                  |
| Okt. 1981 – Sept. 1986 | Chemiestudium an der Universität Bremen                                                                                        |
| Sept. 1983             | Vordiplom                                                                                                                      |
| Mai 1987               | Abschlußprüfung zum akademischen Grad "Diplom-Chemikerin" an der Universität Bremen                                            |
| seit Juli 87           | wissenschaftliche Mitarbeiterin in Forschung und Lehre an der Universität Bremen                                               |











